



УДК 547.963.32

ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ РНК ВЫСОКОЙ УДЕЛЬНОЙ РАДИОАКТИВНОСТИ ИОДИРОВАНИЕМ С ПОМОЩЬЮ ХЛОРАМИНА Т

*Шапошников Я. Д., Зеров Ю. П., Бобров Ю. Ф.,
Ратовицкий Э. А., Иванов С. Д.*

*Научно-исследовательский институт онкологии им. Н. Н. Петрова
МЗ СССР, Ленинград*

Разработан метод иодирования нуклеиновых кислот с помощью хлорамина Т. Метод позволяет вводить *in vitro* ^{125}I в ДНК и РНК. Показано, что модифицированным звеном в РНК является меченый подцитозин. Полученные препараты РНК не деградированы и обладают высокой удельной радиоактивностью. Продукт иодирования мало подвержен радиолизу и термостабилен. Метод прост и легко воспроизводим.

Для получения равномерно меченных препаратов РНК с высокой удельной активностью применяют методы введения радиоактивного изотопа *in vitro* [1—3]. Наиболее широкое применение получил метод иодирования с помощью TiCl_3 [2, 3]. Однако довольно жесткие для РНК условия проведения опыта (15—60 мин, 60—70°) приводят к частичной деградации обрабатываемых препаратов. Недостатком этого метода является также нестабильность TiCl_3 , который, следовательно, приходится готовить непосредственно перед опытом. Кроме того, выделяющийся при реакции K^{125}I с TiCl_3 молекулярный $^{125}\text{I}_2$ в результате длительной инкубации при высокой температуре может заметно улетучиваться в атмосферу, создавая опасность радиоактивного заражения.

Нами была предпринята попытка разработать новый метод получения меченных иодом высокоактивных препаратов РНК в более мягких условиях (предварительные результаты исследования в краткой форме опубликованы в тезисах Закавказской конференции молодых ученых-радиологов [4]).

Иодирование РНК проводили, используя в качестве окислителя хлорамин Т по методу, предложенному для мечения микроколичеств белков [5] с некоторой модификацией.

Первоначально иодированию в присутствии хлорамина Т был подвергнут суммарный препарат, содержащий смесь РНК и ДНК. После очистки от несвязавшегося ^{125}I на сефадексе G-25 препарат был фракционирован с помощью равновесного центрифугирования в градиенте плотности Cs_2SO_4 . При этом основная часть радиоактивного продукта концентрировалась в двух зонах, соответствующих по плавучим плотностям ДНК и РНК (рис. 1). В дальнейшем основное внимание было уделено получению меченых препаратов РНК.

Учитывая, что метод иодирования с помощью хлорамина Т был первоначально предложен для мечения белков, мы считали необходимым иск-

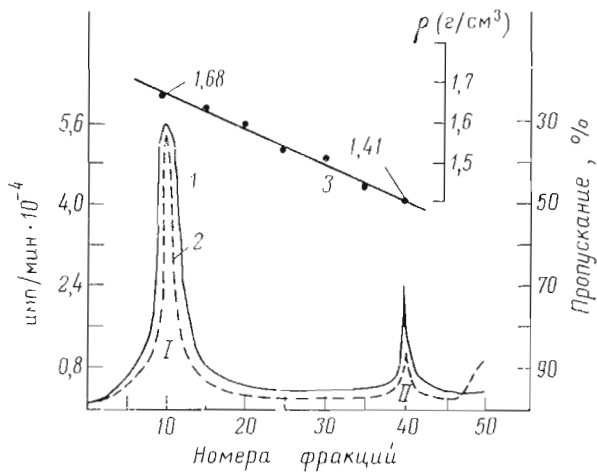


Рис. 1. Ультрацентрифугирование препарата меченой РНК в градиенте плотности Cs_2SO_4 ; свидетель — суммарная РНК печени крысы; I — пропускание при 254 нм, 2 — радиоактивность, 3 — плавающая плотность, пик I — РНК (ρ 1,68 г/см³), пик II — ДНК (ρ 1,41 г/см³)

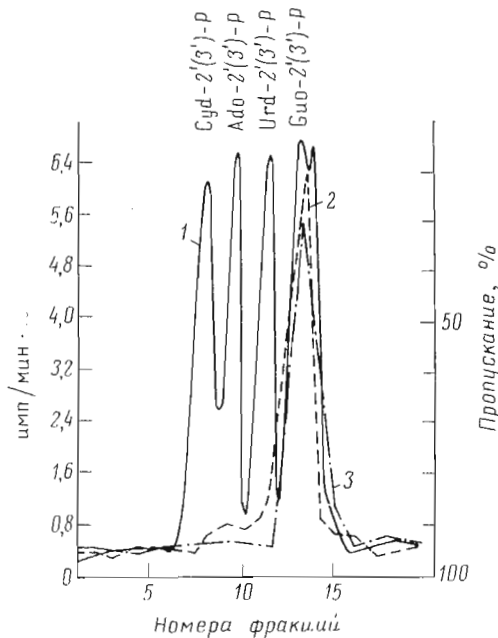


Рис. 2. Колончатая хроматография гидролизата меченой РНК (1, 2) и гидролизата ^{125}I ролу(C) (3) на QAE-сефадексе А-25. К очищенному препарату ^{125}I РНК перед гидролизом в КОН добавлена немеченая РНК печени крысы в качестве свидетеля. Объем фракции 15 мл; 1 — пропускание при 254 нм, 2, 3 — радиоактивность

лючить возможность появления артефактов вследствие вероятного присутствия микропримесей белка в препаратах РНК. С этой целью были получены высокоочищенные препараты РНК методом изопикнического центрифугирования в градиенте плотности CsCl . Результаты иодирования препаратов РНК, не содержащих белка, убедительно показали, что при использовании разработанного нами метода происходит связывание радиоактивного иода с РНК. В дальнейшем в работе использованы только

препараты нуклеиновых кислот, предварительно очищенные в градиенте плотности CsCl.

Известно, что при использовании методов иодирования РНК ^{125}I в присутствии TlCl_3 [2, 3] образуется некоторое количество термолabileльных продуктов мечения [1, 6]. Для их деградации используют нагревание меченых препаратов в слабощелочной или нейтральной среде [1, 6]. Для проверки термостабильности полученных нами препаратов [^{125}I] РНК мы нагревали их 15 мин при 66° в 0,05 М трис-НСI-буфере (рН 8,7), содержащем 0,15 М NaCl. Для предотвращения разрушения РНК нуклеазами к инкубационной смеси добавляли 0,2% лаурилсульфата натрия. После нагревания раствор меченой РНК подвергали повторной гель-фильтрации на сефадексе G-25. Степень термостабильности, определяемая по доле радиоактивности, оставшейся после нагревания во фракции высокомолекулярной РНК, составляла в наших опытах $\sim 90\%$ (84—94%). Таким образом, использование хлорамина Т при иодировании приводит в отличие от результатов по применению других реагентов к практически полностью термостабильному радиоактивному продукту. Это создает существенные преимущества для данного метода при проведении ряда молекулярно-биологических исследований, требующих введения метки, в частности молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот. Следует отметить, что при хранении в течение двух недель препаратов меченой РНК уменьшение радиоактивности высокомолекулярной фракции соответствовало теоретической кривой распада ^{125}I , т. е. отщепления лабильной метки в результате радиолиза РНК не наблюдалось.

Согласно литературным данным [6, 7], иодирование РНК с образованием стабильного продукта мечения идет по 5-положению цитозинового ядра. Мы попытались локализовать метку в наших препаратах, для чего анализировали распределение радиоактивности в смеси нуклеотидов после фракционирования щелочного гидролизата [^{125}I] РНК на QAE-сефадексе А-25. Параллельно проводили фракционирование смеси немеченых рибонуклеотидов в гидролизате иодированной полицитидиловой кислоты, освобожденной от нестабильных продуктов иодирования. Из рис. 2 видно, что радиоактивный продукт в гидролизатах обоих иодированных полинуклеотидов находится в зоне GMP. Таким образом, единственным стабильным звеном в иодированной РНК является иодцитозин.

Следующей нашей задачей была отработка оптимальных условий иодирования РНК. Для этого мы изменяли как количество взятого препарата, так и дозу Na^{125}I .

Согласно результатам проведенных исследований (таблица), при высокой внесенной радиоактивности эффективность иодирования довольно высока (с РНК связывается 22—48% внесенного радиоактивного иода), причем абсолютное количество связавшейся метки увеличивается с воз-

Эффективность иодирования в зависимости от концентраций РНК и Na^{125}I

Количество РНК в пробе, мкг	Внесенная радиоактивность, мкКи	Связанная радиоактивность, мкКи	Уд. акт. РНК, расп./мин·мкг
10	1500	336	$7,5 \cdot 10^7$
100	1000	479	$1,1 \cdot 10^7$
100	500	196	$4,4 \cdot 10^6$
100	100	9,5	$2,0 \cdot 10^5$
100	10	1,6	$4,0 \cdot 10^3$

Примечание. В работе использованы только препараты нуклеиновых кислот, предварительно очищенные в градиенте плотности CsCl.

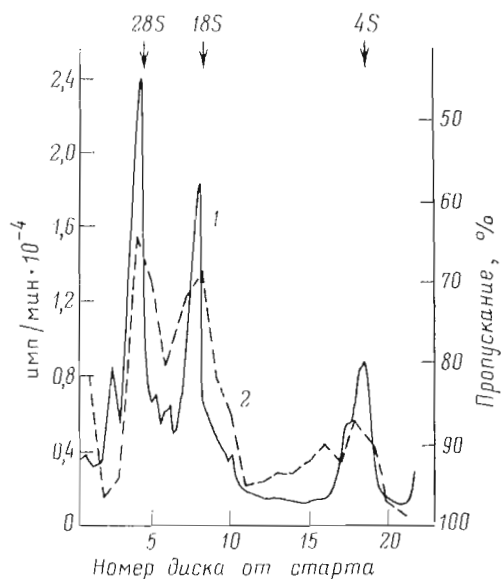


Рис. 3. Аналитический электрофорез $[^{25}\text{I}]$ РНК в 2,5% полиакриламидном геле, свидетель — немеченая РНК печени крысы. Для анализа распределения радиоактивности гели разрезали на диски толщиной 3 мм, которые помещали в пробирки и высушивали при 65° . В каждую пробирку приливали по 1 мл 30% перекиси водорода. Пробы оставляли при 65° на 3 ч. Маркерные РНК обозначены стрелками. 1 — пропускание, 2 — радиоактивность

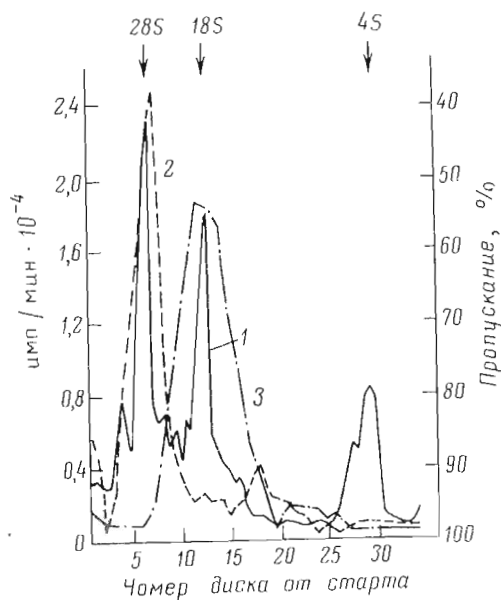


Рис. 4. Аналитический электрофорез меченных иодом прекурсоров 28S- (2) и 18S- РНК (3) в 2,5% полиакриламидном геле; свидетель — суммарная немеченая РНК печени крысы. Определение радиоактивности РНК в гелях проводили путем передвижения трубок с гелями против окошка счетчика с шагом 2 мм. 1 — пропускание, 2, 3 — радиоактивность

растанием содержания РНК в пробе. Однако это увеличение непропорционально мало, что, возможно, объясняется малой продолжительностью реакции (20 с), при которой не достигается состояние равновесия в отличие от других методов [2, 3], где время реакции — 15—60 мин.

В результате этого в наших опытах эффективность иодирования будет определяться в основном скоростью реакции, которая в данной системе (высокомолекулярный биополимер и низкомолекулярная соль) в свою очередь зависит преимущественно от концентрации Na^{125}I . Поэтому для получения препаратов с чрезвычайно высокой удельной радиоактивностью необходимо иодировать незначительные количества РНК. При снижении содержания Na^{125}I в реакционной смеси резко падает не только абсолютное количество связавшейся радиоактивности, но и относительная ее доля. Однако для решения целого ряда молекулярно-биологических задач достаточно высокоактивные препараты можно получить и при довольно низкой внесенной радиоактивности.

Сравнение наших результатов с данными других авторов [1, 6] показывает, что при одинаковом количестве внесенного ^{125}I удельная радиоактивность РНК в наших опытах примерно в 5 раз выше. РНК с такой же удельной радиоактивностью, какую получали вышеуказанные авторы, с помощью нашего метода удается получить с использованием в 20 раз меньших количеств радиоактивного иода (см. таблицу).

Дальнейшей нашей задачей явилось установление влияния процедуры мечения на нативную структуру препаратов РНК. Для этого меченые препараты РНК печени крыс подвергали аналитическому гель-электрофорезу в 2,5% полиакриламиде (рис. 3) с использованием в качестве свидетеля немеченой РНК печени крыс. Как видно из рисунка, радиоактивная РНК сохраняла характерные пики рибосомальных и транспортной РНК, однако некоторое количество радиоактивности распределялось в зонах как между 28S- и 18S-, так и между 18S- и 4S-РНК, что может свидетельствовать о частичной деградации меченых препаратов. Однако по этим результатам невозможно однозначно судить об истинной степени деградации РНК, так как неизвестен точный вклад минорных фракций РНК с промежуточными молекулярными весами в наблюдаемое распределение радиоактивности.

Для выяснения этого вопроса было проведено иодирование выделенных методом препаративного электрофореза фракций 28S- и 18S-рРНК. Полученные препараты [^{125}I] рРНК при аналитическом электрофорезе в полиакриламидном геле обладали такой же подвижностью, как и немеченый свидетель (рис. 4). Только сравнительно небольшая доля радиоактивности (13% для 28S- и 8,2% для 18S- рРНК) обнаруживалась в области более низких молекулярных весов. В случае 28S-рРНК продукты деградации выявлялись в основном в зоне 7—10S, в то время как для 18S-рРНК наблюдался только незначительный сдвиг электрофоретической подвижности части меченой РНК. Полученные результаты убедительно показывают, что при иодировании практически не происходит деградации меченой РНК.

Таким образом, мы разработали простой, удобный, легко воспроизводимый метод иодирования РНК, позволяющий получать стабильные и недеградированные препараты с высокой удельной радиоактивностью при использовании сравнительно малых количеств Na^{125}I .

Экспериментальная часть

Иодирование нуклеиновых кислот. Для иодирования использовали стерильный раствор Na^{125}I без носителя (рН 8—11) с уд. акт. 119 МКп/мл (9,9 Ки/мг I) и содержанием иода $1,2 \cdot 10^{-5}$ г/мл (в/о «Изотоп»).

Для получения меченных иодом-125 препаратов смешивали 0,025 мл раствора РНК в 0,05 М Na-фосфатном буфере (рН 7,4), 200 мкг хлор-

аминa T в 0,025 мл того же буфера и 0,015 мл раствора Na^{125}I . Реакционную смесь встряхивали при комнатной температуре и через 20 с реакцию останавливали добавлением 0,1 мл 0,005 M сульфата натрия и 0,2 мл 0,1 M KI. Меченую РНК отделяли от непрореагировавшего радиоактивного иода, а также от образовавшихся при иодировании продуктов деградации РНК с помощью гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25 с последующей элюцией 0,15 M NaCl.

Деградацию нестабильных продуктов мечения осуществляли нагреванием растворов [^{125}I]РНК в 0,05 M трис-HCl-буфере, содержащем 0,15 M NaCl (рН 8,7), при 66° в течение 15 мин.

Измерение радиоактивности проводили на сцинтилляционном гамма-счетчике VAV-100 (ГДР) с автоматической регистрацией результатов (кристалл NaI/Te с колодцем, эффективность счета не менее 50%).

Препараты суммарной РНК выделяли согласно работе [8] из печени белых беспородных крыс питомника «Рапцолово» АМН СССР. Отношение D_{260}/D_{280} и D_{260}/D_{230} для всех используемых препаратов находилось в пределах 2—2,2. Количество РНК в пробах определяли спектрофотометрически, исходя из коэффициента молярной экстинкции $\epsilon_{(P)}$ 7800 при λ 260 нм [9].

Высокоочищенные препараты РНК получали в ступенчатом градиенте CsCl (по 4 мл 64, 58 и 48% раствора CsCl, приготовленного на 0,15 M NaCl и 0,01 M ацетате Na, рН 5,1), на ультрацентрифуге Spinco-50L в роторе Ti 50 при 35 000 об/мин (14 ч, 16°). Фракции градиента собирали со дна по 0,1 мл. Плотность CsCl (ρ^{25°) во фракциях определяли по формуле

$$\rho^{25^\circ} = 10,8601 \cdot n_D^{25^\circ} - 13,4974,$$

где $n_D^{25^\circ}$ — рефрактометрический индекс РНК, находящуюся в осадке и четырех придонных фракциях ($\rho = 1,762 \text{ г/см}^3$), диализовали в течение ночи против буфера (0,15 M NaCl — 0,01 M ацетат Na, рН 5,1) и осаждали двойным объемом этилового спирта.

Центрифугирование в градиенте плотности Cs_2SO_4 меченой РНК (рис. 1). Насыщенный раствор Cs_2SO_4 готовили на 0,01 M трис-буфере (рН 7,4). Перед употреблением раствор разбавляли в 2 раза тем же буфером. К раствору сульфата цезия ($\rho = 1,700 \text{ г/см}^3$) добавляли меченый нодом неочищенный в градиенте плотности CsCl препарат РНК и в качестве свидетеля — раствор суммарной РНК из печени крыс (оба препарата РНК — в том же буфере), тем самым доводя исходную плотность раствора до 1,500 г/см³. Центрифугирование осуществляли на ультрацентрифуге Spinco-50L в роторе Ti 50 при 37 500 об/мин в течение 62 ч при 15—20°. Фракции градиента собирали со дна пробирок по 0,1 мл. Плотность Cs_2SO_4 определяли по формуле

$$n_D^{25^\circ} = 0,0730\rho^{25^\circ} + 1,2646,$$

где $n_D^{25^\circ}$ — рефрактометрический индекс.

Оптическую плотность регистрировали на приборе Uvicord-2 (I.K.B., Швеция) при 254 нм.

Электрофорез РНК. Аналитический электрофорез (рис. 3, 4) в 2,5% полиакриламидном геле проводили по методике работы [10]; гели окрашивали метиленовым синим [11]. Отмытые гели денситометрировали на модифицированном микрофотометре МФ-4 (ЛМО, Ленинград).

Препаративный электрофорез в 2,5% полиакриламидном геле осуществляли в самодельном приборе в трис-фосфатной буферной системе, содержащей 0,2% лаурилсульфата натрия (рН 7,8), в течение 6 ч при комнатной температуре [10]. На колонку диаметром 14 мм и высотой столба геля 25 мм напосили 2 мг РНК. Плотность тока 10 мА/см², напряжение 20 В, скорость протекания элюирующего буфера 0,5 мл/мин. Собирали фракции 18S- и 28S-РНК и осаждали их этанолом.

Фракционирование нуклеотидов РНК (рис. 2) проводили как описано в работе [12]. Препарат подирированной и освобожденной от нестабильных

продуктов РНК гидролизovali в 0,4 М КОН при 37° в течение 16—18 ч. Раствор КОН нейтрализовали 2 н. НСlO₄, центрифугировали и супернатант наносили на колонку 1 × 35 см с QAE-сефадексом А-25 (Pharmacia, Швеция), уравновешенную 0,015 М Na-карбонатным буфером, рН 9,8. Суд-2'(3')-P, Ado-2'(3')-P, Urd-2'(3')-P и Guo-2'(3')-P элюировали последовательно 0,1; 0,2; 0,3 и 0,5 М растворами NaCl на том же буфере при комнатной температуре. Регистрацию вели на приборе Uvicord-2 (LKB, Швеция).

Аналогично гидролизovali [P²⁵I]poly(C), очищенную от нестабильных продуктов иодирования, и анализировали гидролизат на QAE-сефадексе А-25.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tereba A., McCarthy B. J. (1973) *Biochemistry*, **12**, 4675—4679.
2. Scherberg S., Refetoff S. (1973) *Nature New Biol.*, **242**, 142—144.
3. Commerford S. L. (1971) *Biochemistry*, **10**, 1993—1999.
4. Шапошников Я. Д., Бобров Ю. Ф., Ратовицкий Э. А., Зеров Ю. П., Иванов С. Д. (1975) Материалы I Закавказской научной конференции молодых ученых рентгенологов и радиологов, Тбилиси, с. 88.
5. Hunter W., Greenwood F. (1964) *Biochem. J.*, **91**, 43—55.
6. Getz M. G., Altenberg L. C., Saunders G. F. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **287**, 485—494.
7. Robertson H., Dickson E., Model P., Prenskey W. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 3260—3264.
8. Kirby K. S. (1957) *Biochem. J.*, **66**, 495—503.
9. Лерман М. И., Владимирица Е. А., Терехин В. В., Георгиев Г. П. (1965) *Биохимия*, **30**, 375—387.
10. Loening U. E. (1967) *Biochem. J.*, **102**, 251—257.
11. Peacock A. C., Dingman C. W. (1967) *Biochemistry*, **6**, 1818—1827.
12. Зеров Ю. П. (1976) *Биохимия*, **41**, 35—39.

Поступила в редакцию
9.11.1976

PREPARATION OF RNA WITH HIGH SPECIFIC RADIOACTIVITY BY IODINATION USING CHLORAMINE T

SHAPOSHNIKOV J. D., ZEROV Yu. P., BOBROV Yu. F.,
RATOVITSKI E. A., IVANOV S. D.

*N. N. Petrov Research Institute of Oncology, Ministry
of Public Health of the USSR, Leningrad*

A new method for iodination of nucleic acids using chloramine T has been developed, which allows to obtain *in vitro* ¹²⁵I-labeled DNA and RNA preparations. Labeled iodocytosine is shown to be the product of RNA modification. The RNA preparations thus obtained are non-degraded and possess high specific radioactivity. The iodination product is heat-stable and is insignificantly subjected to radiolysis. The method has the advantage of being simple and easily reproducible.