



УДК 547.963.32.05

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ИНФОРМАЦИОННЫХ РНК ИЗ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КОРОВЫ

*Попендиките В. Х., Слюсаренко А. Г., Сулимова Г. Е.,  
Городецкий С. И.*

*Институт общей генетики Академии наук СССР, Москва*

Проведен сравнительный анализ методов выделения poly(A)-содержащих мРНК (poly(A)-мРНК) из полирибосом и нефракционированного клеточного гомогената лактирующей молочной железы коровы. В обоих случаях использовали различные ингибиторы рибонуклеаз, такие, как гепарин, поливинилсульфат калия, аммонияевая соль ауриINTRикарбоновой кислоты (алюминон), моноиодатетат натрия, гуанидин-HCl, гуанидинтиоцианат, высокие концентрации мочевины. Выделенные различными методами poly(A)-мРНК анализировали электрофоретически, ультрацентрифугированием в градиенте концентрации сахарозы и по стимуляции белкового синтеза в бесклеточной системе из зародышей пшеницы. Наилучшие результаты дали метод фенольно-детергентной экстракции с некоторыми модификациями, метод гомогенизации ткани в присутствии 6 М мочевины и 3 М LiCl и метод, использующий гуанидин-HCl с последующим центрифугированием гомогената в растворе CsCl. Последний метод более удобен для аналитических, чем для препаративных целей. Первые два могут быть использованы и для препаративных опытов. Все методы могут применяться для выделения интактной мРНК не только из молочной железы, но и из других тканей млекопитающих, в том числе из тканей, богатых рибонуклеазами.

Выделение мРНК из тканей самых разных организмов стало в последние годы областью интенсивных исследований. Это связано в первую очередь с быстрым развитием методов генетической инженерии, так как использование мРНК в качестве матриц в обратной транскрипции позволяет синтезировать комплементарную ДНК (кДНК), соответствующую структурной части гена, и использовать ее для клонирования после соответствующих манипуляций над ней. Как мРНК, так и их кДНК могут быть использованы для изучения структуры генома.

Однако выделение очищенных препаратов мРНК до сих пор представляет значительные трудности, что обусловлено главным образом высокой активностью клеточных рибонуклеаз.

Методы выделения тотальной РНК можно условно разделить на две основные группы: 1) методы непосредственной экстракции РНК из нефракционированного клеточного гомогената [1-4], 2) методы выделения РНК из предварительно очищенных полирибосом [5, 6]. В обоих случаях широко применяются различные ингибиторы рибонуклеаз [7-10], спектр которых постоянно расширяется. Тем не менее надежного универсального метода выделения мРНК из клеток высших организмов до сих пор нет.

В данной работе осуществлено выделение препаратов poly(A)-мРНК из лактирующей молочной железы коровы несколькими методами, проведен сравнительный анализ выделенных препаратов и на основе полученных данных предложено несколько модификаций методов выделения, позволяющих получать недеградированные биологически активные препараты РНК из тканей млекопитающих с высокой нуклеазной активностью.

Выбор оптимальных условий выделения недеградированных препара-

Сокращения: мРНК - информационная РНК, рРНК - рибосомная РНК, poly(A)-мРНК - poly(A)-содержащая мРНК, ВТМ - вирус табачной мозаики, алюминон - гетраммонийная соль ауриINTRикарбоновой кислоты, SDS - додецилсульфат натрия, LiDS - додецилсульфат лития.

Выделение тотальной полисомной РНК из лактирующей  
молочной железы коровы

Номер препарата	Соотношение ткань — буфер, г/мл	Ингибиторы	Выход тотальной РНК %, мг/г ткани
1	1 : 3	Гепарин (1 мг/мл)	— **
2	1 : 5	» (500 мкг/мл)	2—2,3 ***
3	1 : 10	» (100 мкг/мл)	0,5
4	1 : 15	ПВС (200 мкг/мл) Гепарин (500 мкг/мл) Бентонит (1%)	1,1
5	1 : 10	Гепарин (500 мкг/мл) Алюминий (1 мМ)	1,9
6	1 : 10	Гепарин (500 мкг/мл) Алюминий (1 мМ) Моноодацетат натрия (15 мМ)	1,8—2,0

\* По данным электрофореза препараты частично деградированы.

\*\* При гомогенизации лизировались ядра.

\*\*\* Препарат использовали для выделения poly(A)-мРНК.

тов poly(A)-мРНК проводили на примере выделения poly(A)-мРНК из лактирующей молочной железы коровы (срок лактации — 7—15 сут). Выбор объекта был обусловлен высокой нуклеазной активностью данной ткани, что позволяло использовать в дальнейшем выбранные условия для выделения мРНК из других тканей млекопитающих, в том числе из тех, в которых содержится значительное количество нуклеаз.

*Выделение poly(A)-мРНК из полисом лактирующей молочной железы коровы.* Одним из наиболее широко распространенных методов выделения мРНК является выделение РНК из предварительно очищенных полисом [5, 6]. Этот метод позволяет получать препараты мРНК, свободные от примесей гетерогенной ядерной РНК, а кроме того, обогатить их молекулами, активно транскрируемыми в данной ткани. Известно [11—13], что в лактирующей молочной железе наиболее активно транскрибируются казеиновые и лактальбуминовая мРНК, содержание которых в ткани может составлять до 50% тотальной мРНК. Казеины являются секреторными белками, и синтез их локализован на мембранно-связанных полисомах [13]. Молекулярные массы казеиновых и лактальбуминовой мРНК известны для нескольких видов млекопитающих [11—13], что позволило использовать эти характеристики для контроля качества выделенных нами мРНК.

Полисомы осаждали ионами магния из цитоплазматического экстракта клеток, обработанного детергентами и освобожденного от ядер, митохондрий и других тяжелых частиц. На стадии гомогенизации ткани был использован целый ряд ингибиторов рибонуклеаз в широком диапазоне концентраций (табл. 1). Тем не менее полученные из полисом препараты тотальной РНК были в значительной степени деградированы. При электрофорезе всех препаратов тотальной полисомной РНК (табл. 1) кроме полос 28S и 18S рРНК видно значительное количество полос как в зоне между 28S и 18S рРНК, так и в области подвижности низкомолекулярных РНК (рис. 1). При этом количество материала, обнаруживаемое в указанных полосах, слишком велико, чтобы его можно было отнести к мРНК (мРНК в препаратах полисомных РНК составляет, как правило, 2—5%). Следовательно, полученная картина электрофореза может свидетельствовать только о частичной деградации полисомной РНК.

Один из препаратов полисомной РНК (препарат 2, табл. 1) был использован для выделения poly(A)-мРНК путем последовательного хроматографирования на poly(U)-сефарозе (выход 1,5—1,8%) и oligo(dT)-целлюлозе (выход — 0,2—0,3% от исходного количества РНК). Низкий выход poly(A)-мРНК (0,2—0,3%) также свидетельствует о частичной деградации исходного препарата. При последующем фракционировании полученной poly(A)-мРНК ультрацентрифугированием в градиенте концентрации

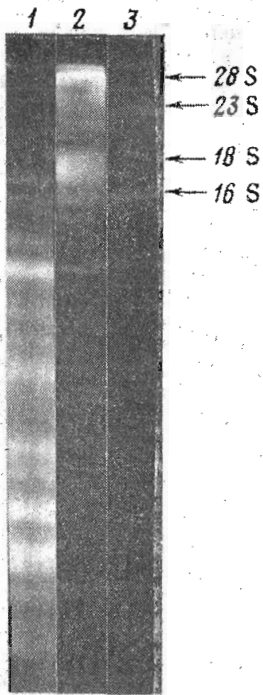


Рис. 1

Рис. 1. Электрофореграмма тотальной полисомной РНК (2, препарат 2, табл. 1) и ролу(А)-мРНК (1, препарат 2, табл. 1) из молочной железы коровы. В качестве маркера использована рРНК *E. coli* (3)

Рис. 2. Ультрацентрифугирование ролу(А)-мРНК, выделенной из полисом лактирующей молочной железы коровы, в линейном градиенте концентрации сахарозы (4–20%). Объем фракции 200 мкл. 1 — поглощение при 260 нм, 2 — количество метки ( $[^3\text{H}]$ лейцин), включенной в белок при трансляции

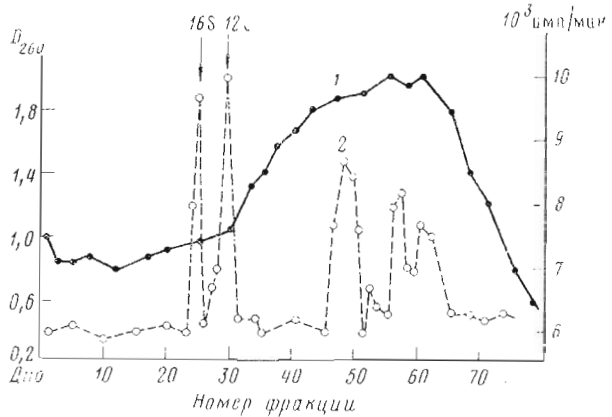


Рис. 2

сахарозы (4–20%) в условиях, описанных в статье [12], было показано, что основное количество мРНК локализовано в зоне от 7S до 5S (рис. 2). Фракции анализировали также по стимуляции синтеза белка в системе трансляции из зародышей пшеницы. Максимальный уровень белкового синтеза при использовании фракций ролу(А)-мРНК в качестве матриц составлял не более 20% синтеза белка, стимулируемого РНК ВТМ. Интересно, что более высокой матричной активностью обладали фракции мРНК, имеющие коэффициенты седиментации 16S и 12S (зоны локализации мРНК  $\alpha$ - и  $\beta$ -казеина [11]), хотя в препарате они составляли лишь незначительную часть. Заметная стимуляция белкового синтеза наблюдалась и для 9S-фракции мРНК (константа седиментации мРНК лактальбумина — 9S [12]). Некоторую матричную активность проявляли и более низкомолекулярные фракции. В целом выделенная из полисом мРНК стимулировала синтез белка в бесклеточной системе из зародышей пшеницы в 3–5 раз, хотя была в значительной степени деградирована. Следовательно, при анализе мРНК из различных объектов необходимо учитывать, что наличие матричной активности мРНК еще не является гарантией отсутствия ее деградации.

На основе полученных результатов можно сделать вывод, что в процессе выделения полисомной РНК происходит значительная деградация мРНК, что объясняется недостаточной эффективностью используемых ингибиторов рибонуклеаз. По-видимому, метод выделения мРНК из тотальной полисомной РНК может быть использован только для тканей со сравнительно низкой нуклеазной активностью.

*Выделение РНК экстракцией из нефракционированного клеточного гомогената.* Метод выделения тотальной клеточной РНК фенольно-детергентной экстракцией [2] в значительной мере гарантирует подавление активности рибонуклеаз, так как гомогенизация ткани ведется в присутствии фенола. Тем не менее прямое воспроизведение метода не дало удовлетворительных результатов. Поэтому нами был проведен ряд экспериментов по подбору оптимальных условий выделения РНК фенольно-детергентным

## Выделение тотальной РНК из лактирующей молочной железы коровы фенольно-детергентным методом

Номер препарата	Соотношение ткань — буфер, г/мл	Ингибиторы	Выход тотальной РНК, мг/г ткани	Качество препарата (полосы на электрофореграммах)	Связывание с roly (U)-сефарозой, % *
1	1 : 5	Гепарин (300 мкг/мл)	1,0	Размытые	1,0 **
2	1 : 5	» (500 мкг/мл)	1,7—1,9	Четкие	2,0
3	1 : 5	Бентонит (0,1%)			
		» (1%)	1,5	Видна только рРНК	0,1
4	1 : 10	Бентонит (0,08%)	2,5	Четкие	2,0
5	1 : 10	» (0,04%)	2,8—3,0	Очень четкие	2,0
		Алюминон (1 мМ)			
6	1 : 10	Гепарин (500 мкг/мл)	2,0	Четкие	1,5—1,8
		Алюминон (1 мМ)			
7	1 : 10	Бентонит (0,04%)	2,0	Очень четкие	2,0
		Алюминон (1 мМ)			
		Моноацетат натрия (10 мМ)			

\* При рехроматографии на oligo(dT)-целлюлозе связывалось 70—80% от количества нанесенного материала.

\*\* При рехроматографии на oligo(dT)-целлюлозе связывалось 40% от количества нанесенного материала.

методом и внесены некоторые модификации в исходную методику (табл. 2).

Растертую в порошок в жидком азоте ткань гомогенизировали в буфере, содержащем детергент и равный объем смеси фенол — хлороформ (1:1). Освободившиеся рибонуклеазы во время гомогенизации ткани достаточно быстро ингибируются смесью фенол — хлороформ, что позволяет выделить препараты недеградированной РНК. Качество препаратов РНК улучшается при использовании некоторых ингибиторов рибонуклеаз (табл. 2).

При использовании 1% бентонита, как указано в работе [8], выделенный препарат тотальной РНК состоял только из рРНК. По-видимому, бентонит сильно сорбирует roly (A)-содержащие РНК, и указанная концентрация бентонита оказалась слишком высокой. Экспериментальным путем были подобраны оптимальные концентрации ингибиторов. Они составили для бентонита 0,04% и для алюминона 1 мМ.

По методу Розена с соавт. [2] из водного раствора сначала удаляли ДНК прибавлением одного объема этанола, а затем осаждали РНК добавлением второго объема этанола. Однако полученный таким образом препарат РНК содержал до 10% ДНК. Для удаления примеси ДНК авторы [2] использовали либо хроматографию препарата РНК на колонках с сефарозой 4В, либо многократную отмывку осадка РНК раствором 3 М ацетата натрия с EDTA. Тем не менее оба способа недостаточно эффективны, так как не позволяют полностью освободиться от примеси ДНК, а кроме того, очень длительны, что в конечном итоге может привести к частичной деградации РНК.

Поэтому мы заменили осаждение РНК этанолом после депротеинизации осаждением высокомолекулярной РНК LiCl (конечная концентрация 2 М). В этом случае в осадок выпадают только высокомолекулярные РНК, а ДНК и низкомолекулярные РНК остаются в растворе. В осадок с РНК увлекаются лишь следовые количества ДНК, которые уже можно удалить промыванием осадка РНК холодным стерильным раствором 2 М LiCl или 3 М ацетата натрия. После такого осаждения и 2—3-кратного промывания осадка препарат РНК практически не содержал примесей ДНК.

На выход тотальной РНК влияет количество буфера, взятого для гомогенизации ткани. Гомогенизация ткани не в 5-кратном (5 мл на 1 г сырого веса ткани), а в 10-кратном избытке (10 мл/г) буфера позволила повысить выход тотальной РНК почти на 30%. Дальнейшее увеличение количества используемого буфера нецелесообразно, так как практически не

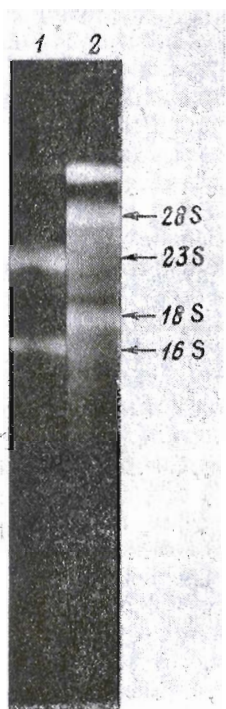


Рис. 3

Рис. 3. Электрофореграмма тотального препарата РНК (2), выделенного фенольно-детергентным методом из лактирующей молочной железы коровы, и рРНК *E. coli* (1)

Рис. 4. Фракционирование poly(A)-мРНК молочной железы, выделенной фенольно-детергентным методом, в градиенте концентрации сахарозы (10–30%). 1 – поглощение при 260 нм фракции рРНК ретикулоцитов кролика, 2 – поглощение при 260 нм фракций poly(A)-мРНК молочной железы коровы, 3 – количество метки ( $^3\text{H}$ )-лейцин, включенной в белок при трансляции фракций poly(A)-мРНК молочной железы коровы

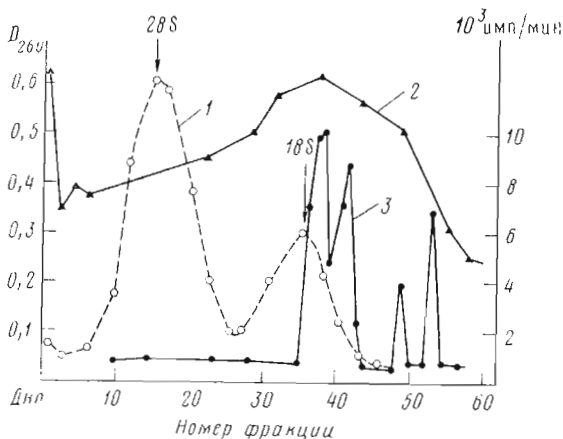


Рис. 4

влияет на выход тотальной РНК, но усложняет процесс выделения препарата из-за больших объемов полученного гомогената. Электрофореграмма (рис. 3) тотального препарата РНК, полученного фенольно-детергентным методом с указанными модификациями (препарат 2, табл. 2), показывает, что препарат РНК содержит рРНК, соответствующие по положению 28S и 18S рРНК, информационные РНК представлены слабыми дискретными полосами, причем значительное количество материала находится в зоне 16S и 12S, что соответствует, согласно [11], положению казеиновых мРНК.

Poly(A)-мРНК из тотального препарата выделяли двукратной хроматографией на колонках с poly(U)-сефарозой и oligo(dT)-целлюлозой и анализировали ультрацентрифугированием в градиенте концентрации сахарозы (рис. 4). Условия центрифугирования несколько изменили (0,2% LiDS, 4° C) по сравнению с условиями, использованными выше (рис. 2), для предотвращения деградации РНК. Средняя молекулярная масса выделенной мРНК, как это видно по профилю седиментации, соответствует ~16S, что хорошо согласуется с литературными данными [11]. Матричную активность фракций мРНК проверяли в бесклеточной белоксинтезирующей системе из зародышей пшеницы. В зонах, соответствующих константам седиментации РНК 16S, 12S и 9S, наблюдалась высокая стимуляция синтеза белка: в 7–10 раз. Уровень белкового синтеза при использовании в качестве матриц 16S, 12S и 9S мРНК составлял соответственно 50, 45 и 35% уровня синтеза белка на РНК ВТМ. Полученный нами профиль седиментации poly(A)-мРНК молочной железы как по поглощению в ультрафиолете, так и по матричной активности фракций в бесклеточной системе биосинтеза белка соответствует аналогичному профилю седиментации, полученному для мРНК молочной железы крысы [11].

Таким образом, с помощью фенольно-детергентного метода с использованием разработанных модификаций получен недеградированный препарат poly(A)-мРНК с высокой матричной активностью из молочной железы коровы.

Одним из наиболее универсальных методов, позволяющих получать недеградированные препараты мРНК даже из таких богатых нуклеазами

тканей, как поджелудочная железа, считаются методы, использующие разрушение клеток в присутствии гуанидин-НСI и гуанидинтиоцианата [3, 14]. Нам был опробован метод, описанный в работе [14]. Гомогенизацию замороженной ткани проводили в буфере, содержащем гуанидин-НСI и 1% LiDS [14]. Нуклеиновые кислоты затем фракционировали в градиенте плотности CsCl [15], при этом на дно пробирки оседала РНК, свободная от ДНК и белков. При электрофоретическом анализе выделенного препарата РНК наблюдались четкие полосы в зоне 28S, 18S, 16S, 12S и ниже. Следовательно, метод позволяет получить недеградированные препараты РНК, однако высокая стоимость используемых реагентов и небольшие объемы ограничивают применение этого метода для выделения РНК в препаративных количествах.

Метод выделения РНК из молочной железы коровы гомогенизацией ткани в присутствии гуанидинтиоцианата с последующей экстракцией РНК из осадка гуанидин-НСI [3] не дал удовлетворительных результатов. Лишь часть РНК экстрагировалась из осадка раствором 4 М гуанидин-НСI, что приводило к большим потерям РНК. По-видимому, использование данного метода при выделении РНК из молочной железы требует дальнейшей обработки.

При гомогенизации ткани был также использован буфер, содержащий 6 М мочевины и 5% 2-меркаптоэтанол. Выбор буфера был сделан на основе данных по ингибированию РНКаз мочевиной и меркаптоэтанолом [16]. Анализ полученных препаратов РНК электрофорезом в 2,5% агарозе с 6 М мочевиной показал, что 28S и 18S рРНК деградированы, основной пик нанесенного на гель материала распределен в зоне от 12 до 4S. Следовательно, использование 6 М мочевины с меркаптоэтанолом недостаточно эффективно для подавления клеточных нуклеаз, и данный метод не обеспечивает выделения недеградированных РНК из богатых нуклеазами тканей.

Другой вариант использования в качестве ингибитора нуклеаз мочевины в сочетании с LiCl оказался более эффективным. Метод достаточно прост и заключается в гомогенизации ткани в 6 М мочевины с 3 М LiCl [4]. Достоинство метода в том, что в присутствии высоких концентраций LiCl высокомолекулярная РНК выпадает в осадок и тем самым на первых же этапах выделения оказывается отделенной от рибонуклеаз (рибонуклеазы, как и большинство других белков, остаются в этих условиях в растворе). Мы несколько модифицировали использованный метод, применяя для экстракции РНК из осадка раствор, содержащий 2% SDS. Эта небольшая модификация позволила резко увеличить выход РНК за счет отсутствия потерь при экстракции ее из осадка и предотвращения деградации РНК при дальнейших манипуляциях. Выделенные РНК не отличались от препаратов, полученных методом фенольно-детергентной экстракции, ни электрофоретически, ни по другим параметрам. Использованный метод эффективен для выделения мРНК из тканей млекопитающих.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что выделение poly(A)-мРНК из полисом может быть успешно только для тканей с низким содержанием нуклеаз. В качестве ингибиторов в зависимости от тканей могут быть использованы гепарин (250–500 мкг/мл), Натриюоацетат (10 мМ), алюминий (1 мМ) и бентонит (не выше 0,04%).

При выделении мРНК из тканей с высокой нуклеазной активностью целесообразнее применять методы выделения тотальной клеточной (или цитоплазматической) РНК, позволяющие использовать более жесткие способы ингибирования нуклеаз, а именно гомогенизацию ткани в присутствии гуанидин-НСI с последующим фракционированием препарата ультрацентрифугированием в присутствии CsCl, гомогенизацию ткани в присутствии смеси фенол — хлороформ с добавлением ингибиторов рибонуклеаз (500 мкг/мл гепарина и 0,04% бентонита или 1 мМ алюминия и 0,04% бентонита) или гомогенизацию ткани в 6 М мочевины, содержащей 3 М LiCl. Первый метод удобен для выделения аналитических количеств мРНК, два других могут быть использованы как для аналитических, так и для препаративных целей.

В работе были использованы аминокислоты, АТФ, ГТФ, трис-ОН, SDS, креатинфосфокиназа и креатинфосфат (Sigma, США), агароза, сахароза (свободная от рибонуклеаз) и мочевины (Bio-Rad, США), LiDS, диэтилпирокарбонат и спермин (Serva, США), EDTA, трис-HCl, HEPES и дитиотреит (Calbiochem, США), poly(U)-сефароза 4 В (Pharmacia, Швеция), oligo(dT)-целлюлоза (PL-Biochemical, США), алюминон (BDE Chemicals, США), гепарин (Spofa, СССР), [<sup>35</sup>S] метионин с уд. акт. 1400 Ки/мМ и [<sup>3</sup>H]лейцин с уд. акт. 160 Ки/мМ (Amersham, Англия). Остальные реактивы были советского производства марки ос.ч. или х.ч., в ряде случаев дополнительно очищенные. ВТМ был получен от сотрудников лаборатории селекции растений Института общей генетики АН СССР Л. И. Извковой и Т. С. Подъяпольской.

Буфер для гомогенизации и все остальные растворы, используемые для выделения и очистки РНК, обрабатывали диэтилпирокарбонатом или автоклавировали. Стеклопосуду также предварительно автоклавировали.

*Выделение полисомной РНК.* Полисомы выделяли из свежемороженой ткани осаждением MgCl<sub>2</sub> по методу, описанному в работе [6]. На стадии гомогенизации ткани в буферный раствор добавляли ингибиторы рибонуклеаз в разных сочетаниях и концентрациях: гепарин (от 0,1 до 1 мг/мл) [7], бентонит (1%) [8], алюминон (1 мМ) [9], поливинилсульфат калия (200 мкг/мл) и Na-моноацетат (15 мМ) [10]. Из очищенных полисом выделяли РНК многократной депротеинизацией смесью фенол — хлороформ (1 : 1) и осаждали этанолом. Полученные препараты полисомной РНК использовали для анализа и выделения poly(A)-мРНК (табл. 1).

*Электрофорез РНК.* Препараты РНК анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозе с 7 М мочевиной [11]. В качестве маркеров использовали рРНК, выделенные из *E. coli* MRE 600 и из ретикулоцитов кролика [1].

*Выделение poly(A)-мРНК.* Poly(A)-мРНК выделяли хроматографией на poly(U)-сефарозе [17] с последующей рехроматографией на колонках с oligo(dT)-целлюлозой [18]. Перед нанесением на колонку с oligo(dT)-целлюлозой раствор РНК обычно прогревали 2 мин при 65° С. Poly(A)-мРНК осаждали этанолом и хранили в 80% этаноле при -20° С.

*Фракционирование РНК с помощью ультрацентрифугирования в градиенте концентрации сахарозы.* Ультрацентрифугирование препаратов poly(A)-мРНК проводили в линейном градиенте концентрации сахарозы (4—20%), содержащей 10 мМ трис-HCl (рН 7,0), 0,1 М NaCl, 1 мМ EDTA, в роторе SW27 (ультрацентрифуга L5-65 фирмы «Beckman») при 27 000 об/мин (20 ч, 15° С) [12].

Для фракционирования poly(A)-мРНК в градиенте концентрации сахарозы использовали 10—30% сахарозы, 10 мМ трис-HCl (рН 7,5), 1 мМ EDTA, 20 мМ LiCl и 0,2% LiDS. Ультрацентрифугирование проводили в роторе SW41 (центрифуга «Beckman») при 35 000 об/мин (17,5 ч, 4° С) [11]. В пробирку наслаивали 400 мкг poly(A)-мРНК, предварительно прогретой 1 мин при 70° С. Фракции собирали со дна пробирки, измеряли их поглощение и осаждали РНК этанолом, осадок растворяли в 100 мкл стерильной воды и использовали для трансляции и других исследований.

*Выделение бесклеточной системы синтеза белка из зародышей пшеницы.* Бесклеточная система синтеза белка из зародышей пшеницы была выделена по методу [19] с некоторыми модификациями [20].

Зародыши пшеницы («Мироновская 808») растирали в ступке с жидким азотом и кварцевым порошком до состояния мелкого порошка, добавляли 2,5—3 объема буфера, содержащего 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ ацетат магния, 100 мМ KCl, 25 мМ HEPES — КОН (рН 7,6) и 2 мМ дитиотреит, и снова тщательно растирали. Гомогенат центрифугировали 20 мин при 23 000g. Надосадочную жидкость (S<sub>23</sub>) собирали и наносили на колонку с сефадексом G-25, уравновешенную буфером, содержащим 120 мМ KCl, 5 мМ ацетат магния, 25 мМ HEPES — КОН (рН 7,6) и 1 мМ дитиотреит, гель-фильтрацию вели в том же буфере. Объединяли фракции, вышедшие в

свободном объеме колонки с поглощением при 260 нм не менее 80 ОЕ. Суммарное поглощение экстракта, используемого для трансляции, составляло 150—200 ОЕ в 1 мл при 260 нм. Полученный экстракт замораживали небольшими аликвотами в жидком азоте и хранили при температуре жидкого азота.

*Трансляция poly(A)-мРНК в бесклеточной системе синтеза белка из зародышей пшеницы.* Инкубационная смесь для трансляции тотальной мРНК содержала 74 мМ КСl, 2,5 мМ ацетат магния, 25 мМ NERPES — КОН (рН 7,0), 2 мМ дитиотреит, 1 мМ АТФ, 0,19 мМ GTP, 27,5 мкМ смесь 19 аминокислот (за исключением меченой аминокислоты), 8 мМ креатинфосфат, 40 мкМ спермин, 8 мкг/мл креатинфосфокиназы [21]. На 50 мкл пробы добавляли 10 мкл экстракта и 40—50 мкКи [<sup>3</sup>H]лейцина или 80—100 мкКи [<sup>35</sup>S]метионина. РНК добавляли из расчета 20 мкг/мл. Смесь инкубировали 1,5 ч при 25° С, добавляли избыток немеченой аминокислоты, которая в инкубационной смеси была радиоактивной, и использовали для определения уровня белкового синтеза по радиоактивности материала, осаждаемого трихлоруксусной кислотой.

В качестве контрольной РНК для тестирования активности системы трансляции использовали РНК ВТМ.

*Выделение РНК ВТМ.* Осадок ВТМ под сернокислым аммонием диализовали на холоду в течение ночи против 1 мМ EDTA и использовали для выделения РНК по методу [22].

*Выделение тотальной клеточной РНК фенольно-детергентным методом.* В основу метода выделения тотальной РНК положен метод, описанный в статье [2], со следующими модификациями. Буфер для гомогенизации содержал, кроме 0,075 М NaCl, 0,025 М EDTA и 0,5% SDS, ингибиторы рибонуклеаз бентонит (от 0,04 до 1%), алюминон (1 мМ), гепарин (300—500 мкг/мл) и Na-моноацетат (10 мМ) в различных комбинациях (табл. 2). После последней депротеинизации высокомолекулярную РНК осаждали добавлением 10 М LiCl до конечной концентрации 2 М и оставляли на ночь при —4° С. Осадок РНК собирали центрифугированием (6000g, 25 мин) и дважды промывали стерильным раствором 3 М ацетата натрия, рН 5,0. Полученную тотальную РНК использовали для выделения poly(A)-мРНК.

*Выделение тотальной РНК с гуанидин-HCl и CsCl.* 40 г замороженной ткани лактирующей молочной железы коровы измельчали и гомогенизировали 2 мин при 16 000 об/мин на гомогенизаторе MPW-302 (Польша) в 160 мл 1% LiDS [14]. К гомогенату добавляли равный объем 8 М гуанидин-HCl и повторно гомогенизировали 1 мин в тех же условиях. Полученный гомогенат центрифугировали 10 мин при 15 000g, к супернатанту добавляли 0,5 объема 96% этанола и выдерживали 1 ч при —20° С. Осадок нуклеиновых кислот отделяли центрифугированием и растворяли в минимальном объеме 1% LiDS, содержащего 10 мМ трис-HCl (рН 7,5) и 10 мМ литиевую соль EDTA. К полученному раствору добавляли CsCl из расчета 1,4 г CsCl на 1 мл раствора и центрифугировали 16 ч на ультрацентрифуге L5-65 (Beckman) в роторе SW27 при 26 000 об/мин [15]. Супернатант сливали, осадок тотальной РНК суспендировали в 70% этаноле, содержащем 0,3 М ацетат натрия, центрифугировали 20 мин при 6000g. РНК от примесей додецилсульфата цезия отмывали 70% этанолом с 0,3 М ацетатом натрия 2—3 раза. Полученный препарат РНК использовали для выделения poly(A)-мРНК.

*Выделение тотальной РНК с мочевиной и меркаптоэтанолом.* 10 г свежемороженой ткани измельчали и гомогенизировали в 50 мл буфера, содержащего 0,025 М трис-HCl (рН 9,0), 0,05 М NaCl, 0,025 М EDTA, 0,5% SDS, 6 М мочевины, 5% 2-меркаптоэтанол и 0,5% бентонит. Условия гомогенизации те же, что описаны выше. Гомогенат многократно депротеинизировали равным объемом смеси фенол — хлороформ, РНК осаждали из водного слоя добавлением 10 М LiCl до 2 М и дальнейшую обработку проводили как описано выше.

*Выделение тотальной РНК с использованием мочевины и LiCl.* Выделение тотальной РНК из молочной железы гомогенизацией ткани в 6 М



мочевине с 3 М LiCl проводили по методу, описанному в работе [4] с некоторыми модификациями. Ткань растирали в жидком азоте и гомогенизировали в охлажденном до  $-10^{\circ}\text{C}$  растворе 6 М мочевины, содержащем 3 М LiCl. Гомогенат оставляли на ночь при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Осадок собирали центрифугированием (12 000 об/мин, 30 мин) и дважды промывали раствором 3 М LiCl. РНК экстрагировали раствором, содержащим 2% SDS, 10 mM трис-HCl (pH 8,5) и 20 mM EDTA. Экстракцию повторяли дважды, объединенные экстракты депротенизировали и РНК из водной фазы осаждали этанолом.

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории селекции растений Института общей генетики АН СССР Л. И. Извековой и Т. С. Подъяпольской за предоставление вируса табачной мозаики.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Brawerman G.* Methods in Enzymology/Eds Moldave K., Grossman L. New York - London: Acad. Press, 1974, v. 30, p. F. p. 605-655.
2. *Rosen J. M., Woo S. L. O., Holder J. W., Means A. R., O'Malley B. W.* Biochemistry, 1975, v. 14, № 1, p. 69-78.
3. *Chirgwin J. M., Przybyla A. E., MacDonald R. J., Rutter W. J.* Biochemistry, 1979, v. 18, № 24, p. 5294-5299.
4. *Auffray C., Rougeon F.* Eur. J. Biochem., 1980, v. 107, № 2, p. 303-314.
5. *Palmiter R. D.* Biochemistry, 1974, v. 13, № 17, p. 3606-3617.
6. *Лейрун В. Л., Лерман М. И.* Биохимия, 1969, т. 34, № 4, с. 839-848.
7. *Palmiter R. D. J.* Biol. Chem., 1974, v. 244, № 21, p. 6779-6787.
8. *Fraenkel-Conrat H., Singer B., Tsugita A.* Virology, 1961, v. 14, № 1, p. 54-58.
9. *Hallick R. B., Chelm B. K., Gray P. W., Orozco E. M. J.* Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 9, p. 3055-3064.
10. *Гайцхоки В. С.* Молекулярн. биология. Итоги науки и техники. М.: ВИНТИ, 1976, т. 7, с. 8-57.
11. *Rosen J. M., Woo S. L. C., Comstock J. P.* Biochemistry, 1975, v. 14, № 13, p. 2895-2903.
12. *Chakraborty P. K., Qasba P. K.* Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 6, p. 2065-2074.
13. *Gaye P., Houdebine L., Denamur R.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1973, v. 51, № 3, p. 637-644.
14. *Cox R. A.* Methods in Enzymology / Eds Moldave K., Grossmann L. New York - London: Acad. Press, 1968, v. 12, p. B, p. 120-129.
15. *Affara N. A., Young B. D.* MSE Application Information, Fisons, 1976, A12/6/76.
16. *Шанор В. С.* В кн.: Химия и биохимия нуклеиновых кислот. М.: Медицина, 1968, с. 176-213.
17. *Lindberg U., Persson T.* Eur. J. Biochem., 1972, v. 31, № 2, p. 246-254.
18. *Aviv M., Leder P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, № 6, p. 1408-1412.
19. *Roberts B. E., Patersson B. M.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, v. 70, № 8, p. 2330-2334.
20. *Караванов А. А., Макаровская Е. Е., Хилько С. Н.* Биохимия, 1977, т. 42, № 9, с. 1682-1689.
21. *Craig R. K., Brown P. A., Harrison O. S., McIlreavy D., Campbell P. N.* Biochem. J., 1976, v. 160, № 1, p. 57-74.
22. *Gafford L. G., Randall C. C. J.* Mol. Biol., 1967, v. 26, № 2, p. 303-310.

Поступила в редакцию  
16.XI.1981

#### COMPARATIVE ANALYSIS OF VARIOUS ISOLATION METHODS FOR MESSENGER RNA FROM COW MAMMARY GLAND

POPENDIKITE V. H., SLUSARENKO A. G., SULIMOVA G. E.,  
GORODETSKY S. I.

*Institute of General Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A comparative analysis of methods for isolating polysomal and total cell poly(A)-containing mRNA (poly(A)-mRNA) from the lactating cow mammary gland has been carried out. Various ribonuclease inhibitors, such as heparin, polyvinylsulfate (K-salt), triammonium aurine tricarboxylate (Aluminon), iodoacetate, guanidine hydrochloride, guanidinium thiocyanate and high urea concentrations have been used in both cases. Poly(A<sup>+</sup>)-mRNAs isolated by various procedures have been analyzed electrophoretically, as well as by ultracentrifugation in sucrose density gradient and by stimulation of protein synthesis in wheat germ cell-free system. The best results have been obtained using the following methods: modified phenol-detergent extraction, tissue homogenization in the presence of 6 M urea and 8 M LiCl, and guanidine hydrochloride-based procedure followed by centrifugation in CsCl. The last one is more convenient for analytical than for preparative purposes, whereas the first two can also be used for preparative experiments. All the above methods can be applied for isolating intact mRNA not only from mammary gland but also from other mammalian tissues including those enriched in ribonucleases.