



УДК 547.963.32'546.11.3*

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ТЕРМИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ
ТРИТИЯ ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ РАДИОАКТИВНОЙ МЕТКИ В РНК***Каширин И. А., Гедрович А. В., Шишков А. В.**Институт химической физики Академии наук СССР, Москва**Каграманова В. Е., Баратова Л. А.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Описан метод мечения препаратов РНК с помощью термически активированного атомарного трития. Получены меченные тритием 5S и 16S рРНК из рибосом *E. coli* с удельной радиоактивностью 30–120 Ки/моль. Молекулы РНК, подвергнутые бомбардировке активированными атомами трития, сохраняют интактность и способность к специфическому нуклеиново-белковому взаимодействию. Показано, что меченая 16S рРНК взаимодействует с белками из малой субчастицы рибосом *E. coli* с образованием нуклеопротеидного комплекса, соответствующего при выделении в градиенте концентрации сахарозы 30S субчастице.

Меченные тритием препараты нуклеиновых кислот находят широкое применение в самых различных областях биохимии и молекулярной биологии. Однако методы их получения, как правило, довольно трудоемки, требуют значительных затрат времени и часто приводят к нежелательной деградации макромолекул или образованию неприродных внутри- и межмолекулярных ковалентных связей [1]. Недавно было показано, что облучение термически активированным атомарным тритием позволяет быстро получать целый ряд меченых природных соединений (в частности, белки, пептиды, гормоны, липиды и др.), не вызывая при этом нарушения их нативности и биологической активности [2–4].

Мы исследовали возможность использования этого метода для получения меченных тритием препаратов рибосомных РНК с целью применения их для изучения ряда вопросов нуклеиново-белкового взаимодействия в рибосомах *E. coli*.

Введение тритиевой метки осуществлялось путем непосредственной бомбардировки замороженных растворов 5S и 16S рРНК атомами трития, получаемыми путем термической диссоциации молекулярного трития на вольфрамовой спирали. Во избежание опасности деградации молекул РНК в результате термического воздействия мишень располагали под углом к спирали, а также использовали тонкие пленки замороженных растворов РНК для более эффективного отвода тепла из зоны реакции. В зависимости от числа напусков газообразного трития в систему были получены препараты рибосомных 5S и 16S РНК с удельной активностью от 30 до 120 Ки/моль. Эксперименты с 5S РНК показали, что удельная активность меченого препарата в исследованном интервале практически не зависит от концентрации и определяется в основном общим количеством облучаемого материала.

Поскольку известно, что введение тритиевой метки в молекулы нуклеиновых кислот может вызывать деградацию полинуклеотидной цепи, димеризацию некоторых гетероциклических оснований и другие побочные процессы [5], препараты РНК, подвергнутые воздействию атомарного

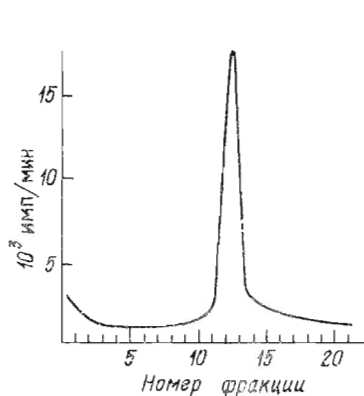


Рис. 1

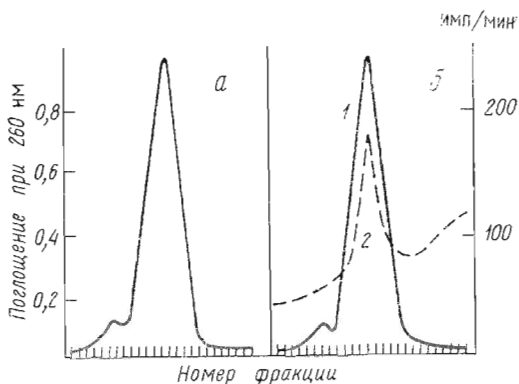


Рис. 2

Рис. 1. Распределение радиоактивности на электрофореграмме при электрофорезе облученной атомарным тритием 5S рРНК в денатурирующем 8% ПААГ

Рис. 2. Седиментация 30S субчастиц рибосом *E. coli* в градиенте концентрации сахарозы (10–30%), ротор SW-50.1; 3,5 ч; 49 000 об/мин: а – контрольный препарат 30S субчастицы; б – 30S субчастица, реконструированная из меченой ^3H 16S рРНК и полного набора 30S рибосомных белков (1 – поглощение при 260 нм; 2 – радиоактивность)

третия, тщательно очищали и анализировали. Для очистки облученной РНК использовали многократное переосаждение из 0,3 М ацетата натрия этиловым спиртом, позволяющее освободить РНК от не включившегося в макромолекулы и обменоспособного («лабильного») трития. После этого препараты РНК подвергали электрофорезу в денатурирующем (содержащем 7 М мочевины) 8% полиакриламидном геле (ПААГ). Проведение электрофореза в этих условиях позволяет отделить исходную РНК от продуктов ее деградации и димеризации и, таким образом, оценить степень целостности препарата, подвергнутого облучению. Немеченые РНК в гелях обнаруживали в УФ-свете или прокрашивали метиленовым синим. Для анализа радиоактивных зон проводили флуорографию гелей или гомогенный счет отдельных зон геля после их растворения, как описано в «Экспериментальной части». Было установлено, что в процессе облучения РНК термически активированным атомарным тритием не происходит ни разрушения, ни димеризации макромолекул. Единственная радиоактивная и УФ-поглощающая зона в геле по электрофоретической подвижности соответствовала исходной 5S или 16S рРНК. На рис. 1 показано распределение радиоактивности в ПААГ при проведении электрофореза облученного тритием препарата 5S рРНК.

Однако образующиеся при воздействии на РНК радиоактивного излучения радикалы могут взаимодействовать друг с другом не только по межмолекулярному, но и по внутримолекулярному механизму. Получающиеся при этом молекулы могут сохранять электрофоретическую подвижность исходных нативных молекул РНК, но утрачивать ряд присущих им других свойств, в частности способность к специфическому взаимодействию с рибосомными белками. Для того чтобы выяснить, сохраняют ли меченые молекулы РНК способность к специфическому комплексообразованию, было изучено взаимодействие тритированной 16S рРНК с белками 30S субчастицы рибосом *E. coli* в условиях реконструкции субчастицы. На рис. 2 приведены профиль УФ-поглощения и кривая распределения радиоактивности, полученные при центрифугировании в градиенте концентрации сахарозы (10–30%) смеси ^3H 16S рРНК и полного набора 30S рибосомных белков, предварительно инкубированной в течение 45 мин при 40° С в реконструирующем буфере. Совпадение пика радиоактивности и УФ-поглощающей зоны, соответствующей 30S субчастице, свидетельствует о включении меченой тритием 16S рРНК в состав специфического нуклеопротеидного комплекса.

Таким образом, данные, полученные в настоящей работе, позволяют заключить, что использование описанного метода введения тритиевой метки дает возможность быстро получать меченые РНК, сохраняющие интактность и способность специфически взаимодействовать с белками. Такие препараты РНК могут быть широко использованы при моделировании различных нуклеопротеидных комплексов, в частности в системах реконструкции рибосом с целью детального исследования их структуры и функции.

Экспериментальная часть

Препараты 5S рРНК (M_r 38 400), 16S рРНК (M_r 524 800) и 30S субчастицы рибосом *E. coli*, штамм MRE-600, были любезно предоставлены А. С. Манькиным.

Электрофорез в 8% ПААГ проводили по методике, описанной в работе [6].

Реконструкцию 30S субчастиц рибосом *E. coli* осуществляли как описано в работе [7]. Буфер для реконструкции содержал 30 мМ трис-НСl (рН 7,7), 20 мМ $MgCl_2$, 0,33 М КСl и 6 мМ меркаптоэтанол.

Введение тритиевой метки в РНК. Водные растворы РНК наносили в виде тонких пленок на охлаждаемую жидким азотом внутреннюю поверхность стеклянного реактора цилиндрической формы. Источник атомов трития (вольфрамовая спираль) был расположен под прямым углом к мишени, что исключало воздействие света на вещество. В работе использовали растворы 5S РНК и 16S РНК с концентрацией 0,05–0,15 и 0,4 мг/мл соответственно. Количество РНК в мишени во всех опытах составляло 0,1–0,2 мг. Согласно методике, описанной ранее [8], систему вакуумировали, заполняли тритием до давления $(2-4) \cdot 10^{-3}$ мм рт. ст. и нагревали вольфрамовую нить до 2000 К в течение 30 с. Описанную операцию повторяли 2–5 раз. Расход газообразного трития при одном напуске составлял 1–5 мКи. Меченый тритием раствор РНК размораживали, переносили в пробирку и 8–10 раз переосаждали из 0,3 М раствора ацетата натрия трехкратным объемом этилового спирта. Химический выход меченых препаратов при 10-кратном переосаждении составлял в среднем для 5S рРНК 60–70, для 16S рРНК – 70–80%. Радиохимический выход в расчете на затраты газообразного трития составлял $10^{-2}\%$ для обеих РНК (мишень – 0,2 мг РНК, суммарный расход трития – 6 мКи).

Флуорографию гелей, содержащих меченные тритием РНК, проводили по методике [9]. Гель вымачивали 30 мин в 1 М растворе салицилата натрия при комнатной температуре, затем высушивали 2–3 ч в вакууме при 80° С и экспонировали с рентгеновской пленкой в течение 5–7 сут при –20° С.

Для проведения гомогенного счета трития в ПААГ полосу геля разрезали на зоны (1×0,5 см), каждую из которых размельчали, заливали смесью 30% H_2O_2 и 25% NH_4OH (99:1 по объему) и инкубировали 12–24 ч при 37° С до полного растворения геля. Затем в каждый образец добавляли по 10 мл диоксанового сцинтиллятора и считали радиоактивность на счетчике фирмы LKB (Швеция).

ЛИТЕРАТУРА

1. Wilzbach K. E. J. Amer. Chem. Soc., 1957, v. 79, № 4, p. 1013.
2. Смоляков В. С., Циренина М. Л., Ушаков А. Н., Нейман Л. А. Биоорган. химия. 1981, т. 7, № 2, с. 284–288.
3. Шишков А. В., Унукович М. С., Румянцев Ю. М., Баратова Л. А., Белякова Л. П., Леднева Р. К., Гольданский В. П. Докл. АН СССР, 1980, т. 251, № 3, с. 751–754.
4. Баратова Л. А., Гольданский В. П., Румянцев Ю. М., Унукович М. С., Шишков А. В. Молекулярн. биология, 1982, т. 16, № 1, с. 117–122.
5. Herak J. H., Gordy W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1965, v. 54, № 5, p. 1287–1292.
6. Sanger F., Coulson A. R. FEBS Lett., 1978, v. 87, № 1, p. 107–110.
7. Held W. A., Mizushima S., Nomura M. J. Biol. Chem., 1973, v. 248, № 16, p. 5720–5730.

8. Шижков А. В., Филатов Э. С., Симонов Е. Ф., Унукович М. С., Гольданский В. И., Несмеянов А. И. Докл. АН СССР, 1976, т. 228, № 5, с. 1237—1239.
9. Chamberlain J. P. Anal. Biochem., 1979, v. 98, № 1, p. 132—135.

Поступила в редакцию
24.IV.1983
После доработки
24.VI.1983

LABELING OF RNA WITH THERMALLY ACTIVATED TRITIUM

KASHIRIN I. A., GEDROVITCH A. V., SHISHKOV A. V.,
KAGRAMANOVA V. K., BARATOVA L. A.

*Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow; M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

A method has been described for labeling the RNA with thermally activated tritium. The procedure has been shown to yield tritiated ribosomal 5S and 16S RNAs with specific activity of 30–120 Ci/mol. After labeling, 16S rRNA is still intact, being capable of reconstitution with the total 30S ribosomal proteins into a nucleoprotein complex whose behaviour on sucrose density sedimentation corresponds to that of the 30S subunit.