



УДК 577.113.4.088.6:546.11*3

ВВЕДЕНИЕ ТРИТИЕВОЙ МЕТКИ В тРНК
МЕТОДОМ ТЕРМИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ ТРИТИЯ

Турчицкий М. Ф., Антропова Л. П., Нейман Л. А.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Действием термически активированных атомов трития получены меченные ^3H препараты суммарной тРНК и индивидуальной тРНК^{Phe} из *E. coli*, имеющие удельную радиоактивность ~ 3 Ки/ммоль при полном сохранении целостности полинуклеотидной цепи и функциональных свойств.

Нуклеиновые кислоты, меченные радиоактивными изотопами, — незаметные инструменты исследования целого ряда проблем, связанных со строением и функционированием этого класса биополимеров. Требования, предъявляемые к тем или иным параметрам меченного соединения (тип радионуклида, положение метки в молекуле, удельная радиоактивность и др.), в зависимости от конкретной задачи исследования могут быть разными. В частности, для многих целей очень удобны препараты, меченные тритием, в которых мягкий характер бета-излучения сочетается с достаточно большим периодом полураспада и относительно высокой удельной радиоактивностью. Дополнительным преимуществом является возможность получать тритийсодержащие соединения не только с помощью химического или ферментативного синтеза, но и методами изотопного обмена, что позволяет вводить метку непосредственно в готовую молекулу биополимера.

При изотопном обмене олиго- и полинуклеотидов с ^3HNO тритий селективно вводится в положение 8 пуринов и в положения 5 и 6 пиримидинов [1, 2]. Однако этот метод требует жестких условий ($60\text{--}100^\circ\text{C}$), не дает возможности достичь высоких значений удельной радиоактивности (менее 20 мКи/ммоль для полинуклеотидов [2]) и приводит к фрагментации нуклеотидной цепи. Имеется также упоминание [3] о введении тритиевой метки в РНК и ДНК с помощью атомов трития, активированных разрядом, но и в этом случае удельная радиоактивность оказалась низкой (10—60 мКи/ммоль), а полученные препараты (тРНК и ДНК фага λ) не были охарактеризованы.

Недавно мы сообщали [4] о получении меченных тритием тРНК и нуклеопротеидов методом изотопного обмена с термически активированными атомами трития, а позже метод термической активации трития был использован [5] для введения трития в рРНК. В настоящей работе результаты нашего предварительного сообщения [4], касающиеся тРНК, описаны более подробно.

Для введения тритиевой метки мы использовали методику, давшую хорошие результаты для различных низкомолекулярных соединений [6—8]. Активированные атомы трития генерировали каталитической диссоциацией газообразного трития на вольфрамовой нити, нагретой до 2200 К в установке, геометрия которой наряду с давлением трития обеспечивала условия свободного пробега атомов трития до тРНК [9]. тРНК равномерно наносили в виде водного раствора на лист хроматографической бумаги, которым после высушивания выстилали стенки реакционного сосуда. Сравнение оптического поглощения растворов тРНК, наносимых на бумажную подложку перед тритированием и элюируемых с этой подложки после тритирования, показывает, что при данных операциях вещество практически не теряется.

Выход и удельная радиоактивность [³H]тРНК

Исходный препарат	Количество ОЕ ₂₆₀ (нмоль)	Объем наносимого раствора, мл	Количество ³ H ₂ , мКи (ГБк)	Выход [³ H]тРНК		Удельная радиоактивность		
				ОЕ ₂₆₀ (нмоль)	%	10 ⁶ (имп/ /мин) / /ОЕ ₂₆₀	Ки / /ммоль	ГБк / /ммоль
Суммарная тРНК из <i>E. coli</i> MRE-600	120 (204)	2	30 (1,11)	90 (153)	75	4,06	3,62	132
Индивидуальная тРНК ^{Phe} из <i>E. coli</i> MRE-600	1 (1,7)	0,2	30 (1,11)	0,48 (0,82)	48	2,76	2,45	90

Для удаления трития, не связанного или лабильно связанного с тРНК, обычно используют лиофилизацию и (или) переосаждение спиртом. Однако при этом часть тритийсодержащих примесей остается в препарате. Поэтому мы совместили операции удаления лабильного трития и очистки тРНК, отмывая тРНК, сорбированную на DEAE-целлюлозе, буферным раствором (0,1 M NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM AcONa, pH 4,5). Это позволяет непрерывно контролировать процесс отмывки лабильного трития (рис. 1), а также удалять различные примеси (например, низкомолекулярные фрагменты тРНК), не сорбирующиеся в этих условиях на DEAE-целлюлозе. Отмытую от лабильного трития тРНК элюировали раствором 1 M NaCl и осаждали этанолом. При такой отмывке некоторое количество препарата теряется вследствие его частичной десорбции с DEAE-целлюлозы (таблица).

Результаты тритирования суммарной тРНК и тРНК^{Phe} из *E. coli* (таблица) свидетельствуют, что полученные препараты обладают весьма высокой удельной радиоактивностью (более 3,5 Ки/ммоль для суммарной тРНК). Содержание трития в водных растворах меченой тРНК (с концентрацией до 10 мг/мл) не изменяется при хранении при -20° C в течение 4-6 месяцев. Электрофорезом [³H]тРНК в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (рис. 2) деградация полинуклеотидной цепи в процессе тритирования не обнаружена. Аминоацилирование суммарной [³H]тРНК фенилаланином *in vitro* показало, что по способности акцептировать фенилаланин исходная и меченая тРНК практически не различаются (1000 пмоль тРНК акцептирует ~20 пмоль фенилаланина). Однако в процессе введения метки только малая часть молекул тРНК непосредственно взаимодействует с атомарным тритием, т. е. степень модификации тРНК может быть очень мала. Следовательно, нельзя исключить, что аминоацилирование происходит только за счет немодифицированной тРНК. В этом отношении более показательны данные, полученные при изучении связывания меченой тритием индивидуальной тРНК^{Phe} с 30S субчастицами рибосом *E. coli* в присутствии poly(U) (рис. 3). Поскольку в этом случае связывание [³H]тРНК^{Phe} с 30S субчастицами определяли по величине радиоактивности, приводимые данные доказывают сохранение функциональной активности именно тех молекул тРНК, которые содержат тритий. Из рис. 3 видно, что более 70% тритийсодержащих молекул тРНК^{Phe} сохранили способность образовывать тройной комплекс с 30S рибосомами и poly(U).

Таким образом, включение ³H в тРНК не приводит ни к заметной деградации полинуклеотидной цепи, ни к существенному изменению ее функциональных свойств. Однако оставалось неизвестным, приводит ли введение трития к модификации меченых звеньев тРНК. Для выяснения этого вопроса нами было изучено распределение трития в мононуклеотидах из гидролизатов [³H]тРНК. Поскольку щелочной гидролиз сопровождается значительной потерей трития компонентами [³H]тРНК (данные не приводятся), гидролиз [³H]тРНК до 5'-мононуклеотидов мы проводили

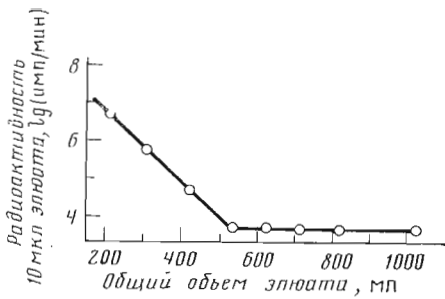


Рис. 1

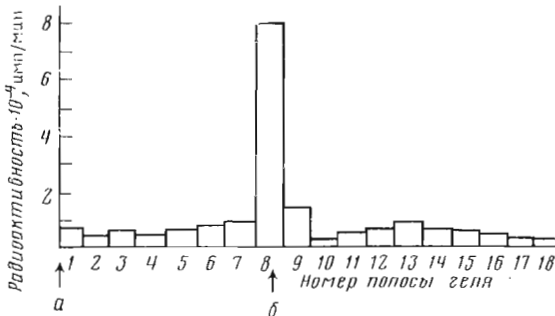


Рис. 2

Рис. 1. Отмывка лабильного трития от меченой суммарной тРНК, сорбированной на DEAE-целлюлозе

Рис. 2. Электрофорез [^3H]тРНК^{Phe} в полиакриламидном геле (см. «Экспер. часть»): а — старт, б — положение тРНК по поглощению в УФ-свете

Рис. 3. Связывание [^3H]тРНК^{Phe} с 30S субчастицами рибосом *E. coli* в присутствии poly(U)

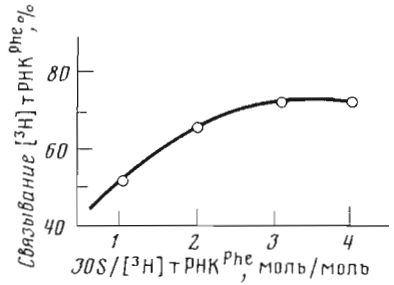


Рис. 3

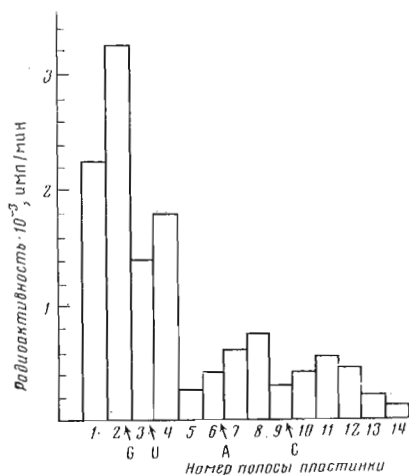
с помощью нуклеазы S1 [10]. Разделение гидролизата хроматографией на пластинках с полиэтилениминцеллюлозой показало, что тритий содержится преимущественно в модифицированных нуклеотидах (рис. 4). Это означает, что существенная часть нуклеотидных звеньев модифицируется тритием. Такая модификация может вызываться различными причинами (присоединение трития по кратным связям, замещение тритием функциональных групп и др.), но экспериментальные данные об этом трудно получить из-за очень небольшой доли модифицированных молекул тРНК. Поскольку эта модификация не приводит к изменению функциональных свойств тРНК, метод термической активации трития позволяет получать препараты, пригодные для функциональных исследований и имеющие достаточно высокую удельную радиоактивность. Значения последней в нашем случае оказались в 25–100 раз выше, чем для [^3H]рРНК, которая также была получена методом термической активации трития [5]. Главная причина такого различия заключается, очевидно, в способе фиксации исходного вещества. Увеличение удельной радиоактивности при нанесении вещества на бумажную подложку (вместо стенок стеклянного сосуда) уже отмечалось ранее [6, 7]. Остается неясным, влияет ли способ нанесения РНК на степень модификации меченой РНК, поскольку в случае рРНК вопрос о модификации не исследовался.

Экспериментальная часть

Препарат суммарной тРНК получен из клеток *E. coli* MRE-600 [11]. Индивидуальная тРНК^{Phe} — препарат фирмы Boehringer (ФРГ). Препарат 30S субчастиц рибосом *E. coli* MRE-600 выделяли по методу [12]. УФ-спектры измеряли на приборе Spexord (Carl Zeiss, ГДР), радиоактивность — на сцинтилляционном счетчике LS 9800 (Beckman, Австрия).

Введение тритиевой метки в тРНК и удаление лабильного трития. Установка и общая методика тритирования были подробно описаны ранее [6–8]. Раствор 5 мг суммарной тРНК в 2 мл воды наносили на лист (220×100 мм) хроматографической бумаги Ватман № 1, предварительно (за сутки) обработанной 1% раствором диэтилпиروкарбоната в этаноле (для подавления активности рибонуклеазы). Бумагу высушивали на воз-

Рис. 4. Распределение трития в 5'-моонуклеотидах, полученных из гидролизата [^3H]тРНК (разделение на полиэтилениминоцеллюлозе). Стрелками показано положение 5'-GMP, 5'-UMP, 5'-AMP и 5'-CMP



духе и выстилали ею стенки реакционного сосуда, охлаждаемого снаружи жидким азотом. Систему вакуумировали до 0,133 Па (10^{-3} мм рт. ст.), сосуд заполняли $^3\text{H}_2$ (1,11 ГБк, 30 мКи) («Изотоп», СССР) до давления порядка 1,33 Па (10^{-2} мм рт. ст.) и, подавая напряжение на вольфрамовую нить, расположенную вдоль оси сосуда, нагревали ее при 2200 К в течение 30 с. После откачки избыточного $^3\text{H}_2$ и образовавшегося ^3HH операцию либо повторяли, либо снимали охлаждение, вскрывали сосуд и элюировали тРНК с бумаги 100 мл воды. Раствор пропускали через колонку, содержащую 2 мл DEAE-целлюлозы (DE 52, Whatman), и отмывали лабильный тритий от сорбированной тРНК буферным раствором (0,1 М NaCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ AcONa, pH 4,5) (рис. 1). По окончании отмывки меченую тРНК элюировали с колонки 20 мл 1 М NaCl. Аналогичным образом проводили тритирование индивидуальной тРНК^{Phe} (45,5 мкг (1700 пмоль) в 200 мкл воды, отмывка на колонке с 0,1 мл DEAE-целлюлозы).

Препараты [^3H]тРНК осаждали этанолом, промывали 70% этанолом, растворяли в воде до концентрации 10–50 ОЕ₂₆₀/мл и хранили при -20°C . Содержание трития в препарате не изменялось в течение 4–6 месяцев (по результатам, полученным при осаждении тРНК трихлоруксусной кислотой).

Анализ целостности полинуклеотидной цепи [^3H]тРНК проводили путем электрофореза в 10% полиакриламидном геле (соотношение акриламида и метиленбисакриламида 10:1), содержащем 8 М мочевины. Буфер в геле и электродный буфер содержали 50 мМ трис-борат и 1 мМ EDTA (pH 8,3). На пластинки геля (5×10×0,1 см) наносили 0,05 ОЕ₂₆₀ ($1,3 \cdot 10^6$ имп/мин) [^3H]тРНК^{Phe} в 20 мкл 50% формамида, содержащего 5 мМ EDTA и по 0,01% красителей — бромфенолового синего и ксиленцианола. Электрофорез проводили при напряжении 20 В/см (10 мА/гель) до выхода бромфенолового синего из геля. Положение тРНК^{Phe} в геле определяли по поглощению в УФ-свете (λ 254 нм). Полосу геля разрезали на участки по 0,5 см, каждый участок элюировали 18 ч 1 мл буферного раствора, pH 5,0, содержащего 0,1 М AcONa, 0,1% додецилсульфата натрия, 0,1 мМ EDTA, 10 мМ MgCl₂. К элюату добавляли по 3 мл сцинтилляционной жидкости Unisolve 1 (Koch-Light, Великобритания) и определяли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике (рис. 2).

Аминоацилирование [^{14}C]фенилаланином образцов суммарной тРНК до и после введения трития проводили по методу [13]. Исходная тРНК включала 36 пмоль [^{14}C]фенилаланина на 1 ОЕ₂₆₀, [^3H]тРНК — 36,2 пмоль/ОЕ₂₆₀.

Связывание [^3H]тРНК^{Phe} с 30S субчастицами рибосом *E. coli*. Реакционную смесь (100 мкл), содержащую 10 мМ MgCl₂, 20 мМ трис-HCl (pH 7,4), 100 мМ NH₄Cl, 75 пмоль [^3H]тРНК, 30–120 мкг poly(U) и 75–300 пмоль 30S субчастиц, инкубировали 1 ч при 0°C . Комплекс 30S·

$[^3\text{H}]$ тРНК poly(U) сорбировали на нитроцеллюлозных фильтрах, радиоактивность которых определяли в толуольном сцинтиляторе (рис. 3).

Распределение ^3H в продуктах гидролиза суммарной $[^3\text{H}]$ тРНК до 5'-моонуклеотидов. 100 мкг суммарной $[^3\text{H}]$ тРНК в 50 мкл буферного раствора, рН 4,5, содержащего 0,05 мМ ZnSO_4 , 50 мМ AcONa и 2,5% глицерина, гидролизovali (ср. [10]) нуклеазой S1 из *Aspergillus oryzae* (PL-Pharmacia, 80 ед. акт., 37°C , 16 ч). Порцию (5 мкл) реакционной смеси ($1,3 \cdot 10^4$ имп/мин, счет в толуольном сцинтиляторе при нанесении на мишень из полиэтилениминоцеллюлозы) наносили на пластинки (11×2 см) полиэтилениминоцеллюлозы (Serva, ФРГ) и проявляли 0,1 М AcOH (первые 2 см) и 1 М AcOH (до верха пластинки). Положение 5'-моонуклеотидов определяли по поглощению в УФ-свете. Пластинку разрезали на полосы длиной $\sim 0,8$ см и измеряли радиоактивность в толуольном сцинтиляторе (рис. 4).

Авторы выражают благодарность Е. К. Ковалевой за выделение 30S субчастиц рибосом и препарата суммарной тРНК из *E. coli* и Э. И. Будовскому за плодотворное обсуждение результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Друца В. Л., Соколова Н. И., Шабарова З. А. Молекулярн. биология, 1974, т. 8, № 6, с. 921–926.
2. Lauschke U., Lodemann E., Wacker A. J. Label. Compounds, 1971, v. 7, № 5, p. 441–444.
3. Тулькес С. Г., Румянцев Ю. М., Шишков А. В. Биофизика, 1978, т. 23, № 6, с. 1098–1099.
4. Neiman L. A., Antropova L. P., Turchinsky M. F., Zalesskaya M. A., Abdurashidova G. G., Budowsky E. I. 10th Radiochemical Conference. Abstract of papers. Mariánské Lázně, Czechoslovakia, 1982, p. 102.
5. Каширин И. А., Гедрович А. В., Шишков А. В., Каграманова В. А., Баратова Л. А. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 11, с. 1531–1534.
6. Нейман Л. А., Смоляков В. С., Антропова Л. П. В сб.: Органические соединения, меченные радиоактивными изотопами. Ч. 1. М.: ЦНИИатоминформ, 1982, с. 33–42.
7. Нейман Л. А., Оноприенко В. В., Смоляков В. С., Соيفер В. С., Третьякова С. Ю., Хохлов А. С. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 1, с. 116–120.
8. Нейман Л. А., Антропова Л. П., Конун В. П., Чепелев В. М., Назаров Е. И. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 1, с. 121–123.
9. Шишков А. В., Филатов Э. С., Симонов Е. Ф., Унукович М. С., Гольдманский В. И., Несмеянов А. Н. Докл. АН СССР, 1976, т. 228, № 5, с. 1237–1239.
10. Vogt K. M. Eur. J. Biochem., 1973, v. 33, № 1, p. 192–200.
11. Zubai G. J. Mol. Biol., 1962, v. 4, № 5, p. 347–356.
12. Семенов Ю. П., Махно В. И., Кириллов С. В. Молекулярн. биология, 1976, т. 10, № 4, с. 754–763.
13. Kirillov S. V., Machno V. I., Semenov Y. P. Eur. J. Biochem., 1979, v. 89, № 1, p. 297–304.

Поступила в редакцию
11.I.1985

tRNA LABELLING BY THE TRITIUM THERMAL ACTIVATION METHOD

TURCHINSKY M. F., ANTROPOVA L. P., NEIMAN L. A.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Tritium labelled *E. coli* total tRNA and tRNA^{Phe} are prepared by action of thermal-ly activated tritium atoms. The preparations, having the molar radioactivity up to 3.6 Ci/mmol, are useful for functional investigations.