



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

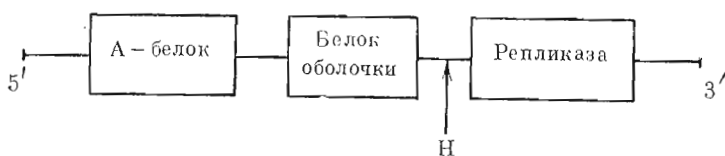
УДК 575.25:547.963.3

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНГИБИТОРА РНКаз ИЗ ПЛАЦЕНТЫ
ЧЕЛОВЕКА ПРИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ФРАГМЕНТАЦИИ
ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ РНК РИБОНУКЛЕАЗОЙ Н*Герасимов В. А., Дегтярев С. Х., Маев С. П.,
Василенко С. Б.**Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии,
пос. Кольцово Новосибирской обл.*

В настоящее время специфическая фрагментация нуклеиновых кислот является одной из наиболее часто используемых операций в ходе генно-инженерных работ и в исследованиях по молекулярной биологии. Существование большого числа сайт-специфических эндонуклеаз рестрикции позволяет проводить ограниченный гидролиз ДНК. Аналогичных ферментов для РНК до сих пор не обнаружено. Один из наиболее перспективных подходов к специфической фрагментации РНК — использование способности рибонуклеазы Н деградировать РНК в комплексе с олигодезоксирибонуклеотидом, выполняющим роль адреса [1–4]. Однако использование этого фермента в случае высокомолекулярных РНК затруднено ввиду наличия в препарате рибонуклеазы Н посторонних РНКаз, от которых трудно избавиться методами хроматографической очистки.

В данной работе показано, что ингибитор РНКаз из плаценты человека подавляет активность примесных РНКаз, не оказывая существенного влияния на активность РНКазы Н, что позволяет использовать его при специфической фрагментации высокомолекулярных РНК.

В качестве субстрата для рибонуклеазы Н была выбрана РНК фага R17, состоящая из 3569 оснований [5] и содержащая уникальную последовательность 5'-AUGAGGAUUACC-3' в межцистронной области (схема).

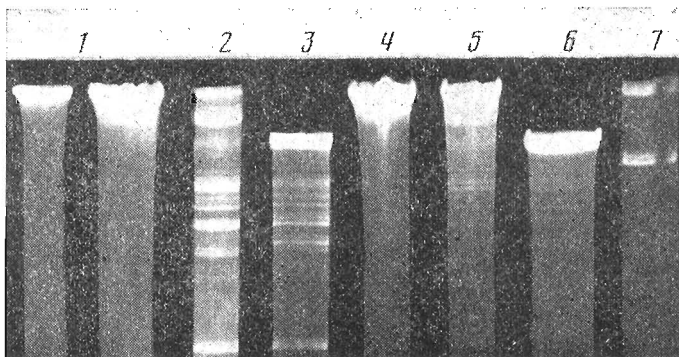


Схематическое изображение генома фага R17. Стрелкой указано место гидролиза рибонуклеазой Н

РНК была выделена из очищенных фаговых частиц фенольной депротеинизацией и центрифугированием в градиенте плотности глицерина, как описано в работе [5]. Субстратом для рибонуклеазы Н является комплекс РНК с 12-членным олигодезоксирибонуклеотидом — GGTAATCCTCAT. Ингибитор РНКаз выделяли из плаценты человека в соответствии с [6].

РНК инкубировали с рибонуклеазой Н согласно методике [1], увеличив температуру и уменьшив время реакции, затем продукты гидролиза подвергали электрофорезу в денатурирующем 4% ПААГ.

На фотোগрафии геля после разделения продуктов гидролиза РНК фага R17 (рисунок) видно, что добавление ингибитора в реакционную смесь приводит к значительному снижению неспецифического гидролиза РНК, однако при этом не наблюдается влияния ингибитора на активность самой



Электрофоретическое разделение продуктов гидролиза РНК фага R17: 1 – РНК фага R17; 2 – РНК+РНКазы Н; 3 – РНК+РНКазы Н+d(GGTAATCCTCAT); 4 – РНК+ингибитор; 5 – РНК+РНКазы Н+ингибитор; 6 – РНК+РНКазы Н+d(GGTAATCCTCAT); 7 – маркеры 23 и 16S рРНК *E. coli*. Инкубацию проводили 30 мин при 37° С в 30 мкл смеси, содержащей 0,01 М трис-НСl (рН 7,8), 0,15 М NaCl, 1 мМ MgCl₂, 2 мМ ДТТ, 4 мкг РНК фага R17, 5 ед. акт. ингибитора, 4 ед. акт. рибонуклеазы Н

рибонуклеазы Н и реакция протекает до завершения образования двух примерно равных фрагментов РНК.

Таким образом, присутствие ингибитора позволяет значительно уменьшить влияние примесных РНКаз, проводить высокоспецифический гидролиз РНК при относительно высоких температурах, что помимо прочего позволяет уменьшить эффект неспецифического «налипания» олигонуклеотидного адреса, который наблюдается при температурах, близких к 0° С.

Авторы благодарят В. А. Петренко за предоставленный олигонуклеотид, М. М. Бакланова за предоставление препарата РНКазы Н и С. В. Нетесова за полезное обсуждение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Метелев В. Г., Степанова О. Б., Чичкова Н. В., Родионова Н. П., Смирнов В. Д., Богданова С. Л., Сергеева Н. Ф., Ратманова К. И., Богданов А. А., Шабарова З. А., Атабеков И. Г. Биол. науки, 1978, № 8, с. 27–30.
2. Meteleev V. G., Rodionova N. P., Chichkova N. V., Atabekov I. G., Bogdanov A. A., Shabarova Z. A., Berzin V., Jansone I., Gren E. J. FEBS Lett., 1980, v. 120, № 1, p. 17–20.
3. Гайда Г. З., Колосов М. И., Чичкова Н. В., Богданов А. А. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 5, с. 678–683.
4. Гайда Г. З., Скундэ А. Я., Скрипкин Е. А., Каграманова В. К., Вейко В. П., Чичкова Н. В., Богданов А. А. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 8, с. 1052–1062.
5. Min Jou W., Fiers W. J. Mol. Biol., 1976, v. 106, p. 1047–1060.
6. Blackburn P. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 24, p. 12484–12487.

Поступило в редакцию
25.I.1985

USE OF HUMAN PLACENTA RNase INHIBITOR IN THE SPECIFIC FRAGMENTATION OF HIGH MOLECULAR WEIGHT RNAs BY RIBONUCLEASE H

GERASIMOV V. A., DEGTAREV S. Kh., MAYEV S. P., VASILENKO S. K.

All-Union Research Institute of Molecular Biology, Kol'tsovo,
Novosibirsk Region

Human placenta RNase inhibitor has been shown to suppress the interfering ribonucleases, virtually not affecting the RNase H activity. This allows the usage of the inhibitor in the course of site-specific cleavage of high molecular weight RNAs by ribonuclease H.