



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.963.32.02:577.155

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НУКЛЕАЗЫ S_1 И ЭНДОНУКЛЕАЗЫ
ИЗ ЯДА КОБРЫ В ИЗУЧЕНИИ СТРУКТУРЫ 5S РНК *E. COLI*

Спээк М. А., Устав М. В., Динд А. Я.

*Институт общей и молекулярной патологии Тартуского
государственного университета, Тарту*

Саарма М. Ю.

*Институт химической и биологической физики
Академии наук ЭССР, Тарту*

В результате использования современных экспресс-методов секвенирования нуклеиновых кислот расшифрована первичная структура целого ряда РНК, что в свою очередь выдвигает на повестку дня вопрос изучения их вторичной и третичной структуры. В настоящей работе на примере 5S РНК *E. coli* предлагается новый быстрый способ выяснения конформации РНК. Этот способ заключается в секвенировании фрагментов гидролиза РНК, образующихся под действием двух структурно-специфичных нуклеаз: S_1 -нуклеазы из *Aspergillus oryzae* и эндонуклеазы из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*. S_1 -нуклеаза специфически гидролизует неспаренные участки РНК и ДНК [1-7] и успешно использовалась при изучении структуры тРНК [1-4] и 5,8S РНК [5, 6]. Эндонуклеаза из яда кобры, напротив, специфически расщепляет фосфодиэфирные связи в спаренных участках РНК (С. К. Василенко, личное сообщение). Таким образом, эти две противоположно действующие структурно-специфические нуклеазы были использованы нами как тесты для выявления спаренных и неспаренных участков в молекуле 5S РНК.

Секвенирование 5'-меченой [^{32}P]-5S РНК *E. coli* MRE 600 и разделение продуктов частичного гидролиза проводили по методам Донис-Келлер и соавт. [8] и Симонцитс и соавт. [9]. Полученные данные представлены на рис. 1, откуда видно, что S_1 -нуклеаза атакует предпочтительно фосфодиэфирные связи в положениях C^{38} , A^{39} , U^{40} , G^{41} и A^{45} (рис. 1, полосы 4 и 5). Кроме того, был установлен еще ряд минорных сайтов S_1 -нуклеазной атаки — A^{66} , U^{77} , C^{88} , U^{89} , U^{103} и A^{108} (данные не приводятся) и C^{12} , U/G^{13} , U^{14} , A^{15} , U^{22} , C^{37} , C^{38} , A^{39} , A^{46} , A^{52} , U^{55} , A^{57} и A^{58} (рис. 1, полосы 4 и 5). Следовательно, все перечисленные выше основания располагаются в неспаренных участках молекулы 5S РНК *E. coli*. При температурах 0 и 23° С существенных различий в картине S_1 -нуклеазной деградации не обнаружено (рис. 1, полосы 4 и 5), тогда как при 40° С отмечалось плавление спаренного участка между последовательностями $\text{C}^{30}-\text{A}^{31}$ и $\text{U}^{43}-\text{G}^{54}$, содержащего пять пар оснований (рис. 1, полоса 3). Такой вывод вполне оправдан, поскольку появление новых сайтов атаки не связано с повышением активности фермента при 40° С [7] (рис. 1, полоса 2).

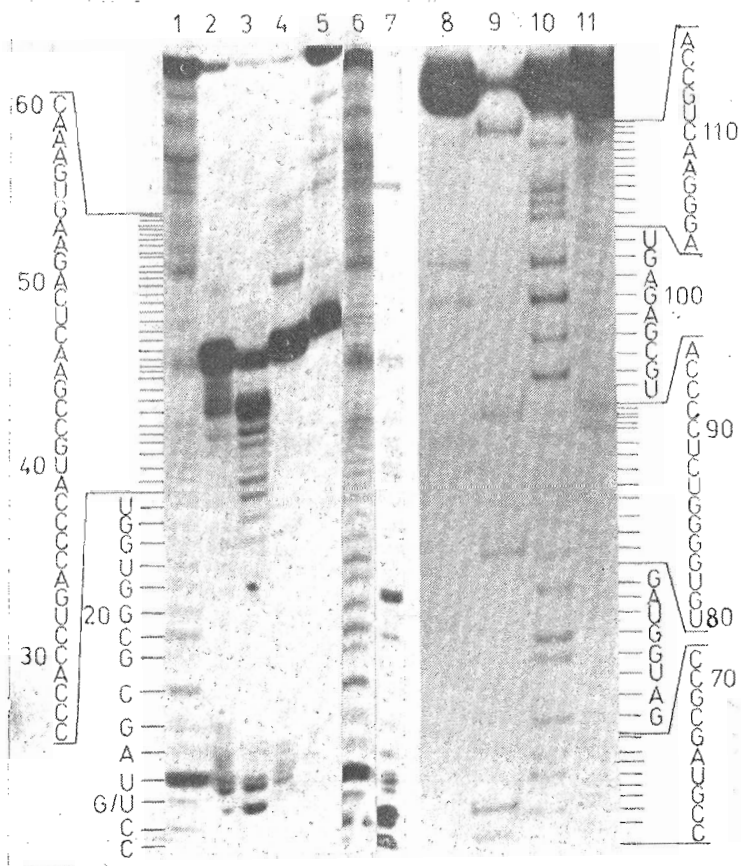


Рис. 1. Авторадиография электрофореграмм продуктов неполного гидролиза 5S РНК *E. coli* в 20% ПААГ. Условия гидролиза 5S РНК: полосы 1, 6 и 11 — бидистиллированная вода, 100° С; 2–5 — S₁-нуклеаза+0,03 М Na-ацетатный буфер, рН 4,6, содержащий 0,1 М NaCl, 0,001 М ZnCl₂ и 5% глицерин при температурах: 2 — 40° С в присутствии 0,3% додецилсульфата натрия; 3 — 40° С; 4 — 23° С и 5 — 0° С; 7, 9 — эндонуклеаза из яда кобры+0,05 М трис-НСl-буфер, рН 7,5, содержащий 0,2 М NaCl и 0,02 М MgCl₂ при 0° С; 8 — T₁-РНКаза+0,05 М трис-НСl-буфер, рН 7,5, содержащий 0,2 М NaCl и 0,02 М MgCl₂ при 0° С; 10 — T₁-РНКаза+Na-цитратный буфер, рН 5,0, содержащий 7 М мочевины и 0,001 М EDTA при 50° С. В каждую реакцию брали (1–2) · 10⁴ имп/мин [5'-³²P]-5S РНК. Концентрация 5S РНК 0,4 мг/мл, объем реакционной смеси 12 мкл

Эндонуклеаза из яда кобры, согласно нашим данным, расщепляет преимущественно G- и C-богатые регионы — C¹⁰–C¹¹, G¹⁸, G²⁰, G⁸⁴–U⁶⁵, G⁸¹, C⁹⁰–A⁹⁴, C¹¹³–C¹¹⁴ и, в меньшей мере, C¹², G²³, C²⁷–C²⁸, C³⁷–C³⁸, G⁵⁴, C⁶²–C⁶³, C⁷⁰–C⁷¹, U⁸²–C⁸³ и G⁸⁶ (рис. 1, полосы 7 и 9). Эти основания, исходя из свойств эндонуклеазы яда кобры, должны располагаться в спаренных участках молекулы 5S РНК. Следует отметить, что некоторые фосфоэфирные связи — в положениях C¹², C³⁷ и C³⁸ — гидролизуются обеими нуклеазами, причиной чего является локализация этих остатков в местах перехода спаренных участков в неспаренные.

Нам не удалось точно определить остатки U⁸⁹–A⁹⁴ из-за сильной компрессии данного участка (рис. 1, полоса 11), обусловленной, по всей вероятности, спариванием C⁹⁰–C–C⁹³ с G⁸³–G–G⁸⁶. В пользу этого предположения свидетельствуют и результаты гидролиза 5S РНК T₁-РНКазой, показавшие исключительную резистентность к действию этой рибонуклеазы (рис. 1, полоса 8) участка G⁸³–G–G–G⁸⁶, гидролизующегося лишь в денатурирующих условиях (рис. 1, полоса 10).

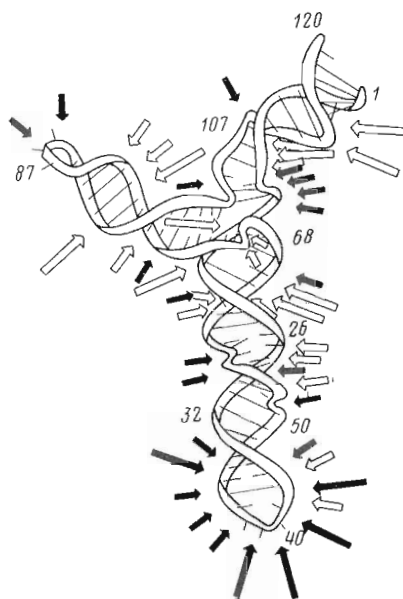


Рис. 2. Места атак структурно-специфических нуклеаз на пространственной модели 5S РНК [12]: темные стрелки — S_1 -нуклеазой, светлые стрелки — эндонуклеазой из яда кобры. Длина стрелки условно указывает на доступность данной фосфодиэфирной связи

Таким образом, нами впервые энзиматически доказана неспаренность последовательности $C^{37}-C-A-U-G-C-C-G-A-A^{46}$, что соответствует так называемой большой петле около 40-го нуклеотида [10], в которой располагается тетра-нуклеотидная последовательность GAAC, участвующая в связывании тРНК с большой рибосомной субчастицей (см. обзор [11]). Наши данные подтверждают пространственную модель 5S РНК *E. coli* (рис. 2), предложенную Эстербергом и соавт. [12], и свидетельствуют о том, что использование структурно-специфических нуклеаз является быстрым и простым методом изучения структуры РНК и может оказаться весьма ценным при исследовании разных конформационных состояний РНК.

Авторы приносят глубокую благодарность С. К. Василенко (Новосибирский институт органической химии СО АН СССР) за любезно предоставленный нам фермент эндонуклеазы из яда кобры и Р. Л.-Э. Виллемсу (Институт химической и биологической физики АН ЭССР, г. Тарту) за ценные советы при обсуждении результатов данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wurst R. M., Vournakis J. N., Maxam A. M. (1978) *Biochemistry*, **17**, 4493–4499.
2. Wrede P., Wurst R. M., Vournakis J. N., Rich A. (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 9608–9616.
3. Wrede P., Rich A. (1979) *Nucl. Acids Res.*, **7**, 1457–1468.
4. Wrede P., Woo N. H., Rich A. (1979) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 3289–3293.
5. Pavlakis G. N., Jordan B. R., Wurst R. M., Vournakis J. N. (1979) *Nucl. Acids Res.*, **7**, 2213–2238.
6. Khan M. S. N., Maden B. E. H. (1976) *FEBS Lett.*, **72**, 105–110.
7. Vogt V. M. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **33**, 192–200.
8. Donis-Keller H., Maxam A. M., Gilbert W. (1977) *Nucl. Acids Res.*, **4**, 2527–2537.
9. Simonsits A., Brownlee G. G., Brown R. S., Rubin I. R., Guilley H. (1977) *Nature*, **269**, 833–836.
10. Vigne R., Jordan B. R., Monier R. (1973) *J. Mol. Biol.*, **76**, 303–311.
11. Erdmann V. A. (1976) *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, **18**, 45–90.
12. Österberg R., Sjöberg B., Garrett R. A. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **68**, 481–487.

Поступило в редакцию
8.VII.1980

STRUCTURAL STUDIES OF *E. COLI* 5S RNA WITH S_1 NUCLEASE
AND ENDONUCLEASE FROM COBRA VENOM

SPEEK M. A., USTAV M. B., LIND A. J., SAARMA M. J.

*Institute of General and Molecular Pathology, Tartu State University, Tartu:
Institute of Chemical Physics and Biophysics, Academy of Sciences of the
Estonian SSR, Tartu*

E. coli 5S RNA was specifically hydrolyzed using S_1 nuclease to reveal single-stranded areas, and endonuclease from cobra *Naja naja oxiana* venom to locate double-stranded regions. The products of the partial enzymatic digestion were identified by a rapid gel sequencing procedure. Data obtained with S_1 nuclease showed two single-stranded regions: C¹²-A¹⁵ and C³⁷-A⁴⁶, and unpaired residues U²², A⁵², U⁵⁵, A⁵⁷, A⁵⁸, A⁶⁶, U⁷⁷, C⁸⁸, U⁸⁹, U¹⁰³, A¹⁰⁸. Endonuclease from cobra venom hydrolyzed a double-stranded G-C rich region most easily at base residues C¹⁰, C¹¹, G¹⁸, G²⁰, G⁶⁴, U⁶⁵, G⁸¹, C⁹⁰-C⁹⁴, C¹¹³, C¹¹⁴. These results are consistent with the three-dimensional model of 5S RNA proposed by Österberg et al. A combination of these two conformationally specific endonucleases is demonstrated to be a powerful tool for rapid structural studies of RNA.
