

- В. Н. Глушак, А. П. Демченко, Н. Н. Орловская, М. Ф. Гулый // Молекуляр. биология.— 1984.—18, № 5.— С. 1330—1335.
18. Корнелюк А. И., Мацука Г. Х., Шилин В. В. Флуоресцентный анализ доступности триптофановых остатков лейцил-тРНК-синтетазы в фермент субстратных комплексах // Биофизика.— 1980.—25, № 3.— С. 402—404.
19. Черницкий Е. А. Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке.— Минск: Наука и техника, 1972.—278 с.
20. *Permyakov E. A., Burstein E. A.* Some aspects of studies of thermal transitions in proteins by means of their intrinsic fluorescence // Biophys. Chem.— 1984.—19, N 2.— P. 265—271.

Каунас. мед. ин-т

Получено 28.10.85

УДК 547.963.3

ВЫДЕЛЕНИЕ ТРАНСЛЯЦИОННО АКТИВНОЙ ПОЛИ(А)⁺ И ПОЛИ(А)⁻ мРНК ИЗ ЦИТОПЛАЗМЫ ПРОРАСТАЮЩИХ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ

Н. Г. Филимонов, А. О. Агашкин, О. Д. Саблина, М. А. Айтхожин

Введение. Проведенные нами ранее исследования цитоплазматических мРНК в прорастающих зародышах пшеницы показали, что они локализованы в составе полирибосом и свободных информосом [1, 2]. Свободные информосомы, очевидно, представляют запасную или временно неактивную форму мРНК [3]. Было установлено, что в составе полирибосом около 40 % мРНК полиаденилированы, в то время как в составе свободных информосом большинство мРНК не содержат полиадениловых последовательностей [4]. Исследование метаболических взаимоотношений между этими популяциями поли(А)⁺ и поли(А)⁻ мРНК представляет большой интерес для изучения биогенеза информационной РНК. В настоящее время общепринятым методом выделения поли(А)⁺ мРНК является хроматография на олиго(dT)-целлюлозе, тогда как очистка поли(А)⁻ мРНК представляет значительные трудности.

В нашей работе из полирибосом и свободных цитоплазматических информосом прорастающих зародышей пшеницы хроматографией на олиго(dT)-целлюлозе и бензоилированной целлюлозе выделены препараты поли(А)⁺ и поли(А)⁻ мРНК. Проведено сравнительное исследование их молекулярно-весовых характеристик и трансляционной активности в бесклеточной белоксинтезирующей системе.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на зародышах пшеницы сорта «Казахстанская-4». Зародыши выделяли из сухих семян и проращивали при 26 °С в течение 20 ч, как описано ранее [5].

Выделение полирибосом и свободных цитоплазматических информосом. Зародыши пшеницы после проращивания замораживали в жидком азоте и гомогенизировали в буферном растворе: 0,01 М трис-НСl, рН 8,0, 0,05 М КСl, 0,005 М MgCl₂, 0,25 М сахараза; 0,005 М 2-меркаптоэтанол (МЭ), 0,01 М ванадилрибонуклеозидный ингибитор (VRC). Гомогенат центрифугировали при 3000 g для освобождения от ядер и неразрушенных клеток, затем при 23000 g — от митохондрий и хлоропластов. К постмитохондриальному клеточному экстракту добавляли тритон X-100 до конечной концентрации 0,5 % и наслаивали его на 10 мл 1,5 М сахаразы. Центрифугированием при 43000 об/мин и температуре 3 °С в течение 3 ч в роторе Туре-45·Ti полирибосомы осаждали на дно пробирки.

Для выделения фракции внеполисомных мРНК-содержащих рибонуклеопротеидов клеточный экстракт после осаждения полирибосом подвергали ультрацентрифугированию через 0,5 М сахаразу в течение 5 ч при 43000 об/мин в роторе Туре-45·Ti, 3 °С. Свободные цитоплазматические информосомы получали после дополнительной очистки препарата в градиенте концентрации сахаразы 15—30 %.

Выделение цитоплазматических РНК из полирибосом и внеполисомных информосом проводили по методу Перри и др. [6].

Хроматографию на олиго(dT)-целлюлозе для очистки поли(А)-содержащей мРНК из полирибосом проводили по стандартной процедуре [7].

Синтез бензоилированной целлюлозы. Необходимо отметить, что применяемые в синтезе пиридин и бензоилхлорид должны быть очищены и обезвожены. Мы использовали тщательно высушенную целлюлозу CF II фирмы «Whatman» (Англия). Бензоилирование проводили в точном соответствии с методикой, описанной Джилламом и др. [8].

Хроматография РНК на бензоилированной целлюлозе. Перед хроматографией РНК растворяли в 50 мМ трис-НСI буфере, рН 7,4, содержащем 0,3 М NaCl, 1 мМ ЭДТА, до конечной концентрации 0,4—0,6 мг/мл и наносили на колонку с бензоилированной целлюлозой, промытой этим же буфером. Элюцию связавшегося материала проводили раствором 50 %-ного этанола и 0,05 мМ ЭДТА, рН 7,4.

Электрофоретический анализ РНК в агарозном геле. Электрофорез РНК проводили в горизонтальном 2 %-ном агарозном геле при напряженности 4 В/см в 0,01 М трис-НСI буфере, рН 7,9, содержащем 0,001 М ЭДТА, 0,02 М Na-ацетат. После обработки бромистым этидием гели освещали УФ и фотографировали, негативы сканировали на микроденситометре МД-100 (ГДР).

Трансляция мРНК в белоксинтезирующей системе из зародышей пшеницы. Трансляцию мРНК проводили в бесклеточной белоксинтезирующей системе из покоящихся зародышей пшеницы по модифицированной методике Маркуса и др. [9]. Реакционная смесь объемом 0,1 мл содержала: 20 мМ HEPES-KOH, рН 7,6, 140 мМ К-ацетат, 3 мМ Mg-ацетат, 8 мМ 2-МЭ, 50 мкМ спермин, 40 мкМ 19 немеченых аминокислот за исключением метионина, 0,4 МБк [³⁵S]метионина (ВО «Изотоп», Ташкентское отделение), 1,25 мМ АТФ, 0,4 мМ ГТФ, 10 мМ креатинфосфат, 5,3 мкг креатинфосфокиназы, 10 мкг тРНК, S23 из зародышей пшеницы в количестве 0,25 ед. А₂₈₀. Инкубацию бесклеточной системы проводили 1 ч при 28 °С. По окончании инкубации определяли радиоактивность кислотонерастворимой фракции в соответствии со стандартной процедурой.

Результаты и обсуждение. Принципиальная возможность использования бензоилированной целлюлозы для очистки мРНК, имеющей в растворе менее выраженную вторичную структуру по сравнению с другими РНК, ранее была продемонстрирована в работе Робертса [10].

На рис. 1 представлена картина электрофоретического анализа тотальной цитоплазматической РНК зародышей пшеницы, фракционированной на бензоилированной целлюлозе, из чего следует, что бензоилированная целлюлоза преимущественно связывает мРНК (рис. 1, в), в то время как несвязавшаяся фракция (рис. 1, б) в основном содержит рибосомные и другие РНК. Однократной хроматографией удается получить практически чистые препараты мРНК.

Используя хроматографию на олиго(dT)-целлюлозе и бензоилированной целлюлозе мы выделяли поли(А)⁺ и поли(А)⁻ мРНК из полирибосом и свободных информосом.

С этой целью суммарная РНК полирибосом была фракционирована на олиго(dT)-целлюлозе. Связавшуюся с олиго(dT)-целлюлозой поли(А)-содержащую фракцию РНК дополнительно очищали повторной хроматографией и подвергали электрофорезу в 2 %-ном агарозном геле. На рис. 2, а приведена сканограмма электрофоретического распределения очищенной поли(А)⁺ мРНК. Видно, что препарат практически не содержит примесей других РНК и имеет характерное гетерогенное распределение в области 8—23S.

Далее несвязавшуюся с олиго(dT)-целлюлозой РНК фракционировали на колонке с бензоилированной целлюлозой. Сканограмма электрофоретического распределения очищенной поли(А)⁻ мРНК полирибосом показана на рис. 2, б. Электрофоретический анализ свидетельствует об отсутствии видимых загрязнений в полученном препарате мРНК другими видами РНК (рРНК, тРНК). Ее электрофоретическое распределение существенно не отличается от электрофоретического распределения поли(А)⁺ мРНК.

Следует отметить, что поли(А)-содержащие мРНК обнаруживаются только во фракции полирибосом, в то время как во фракции сво-

бодных информосом нет заметного количества полиаденилированных молекул.

С помощью хроматографии на бензоилированной целлюлозе нами была выделена поли(А)- мРНК из свободных цитоплазматических информосом. На рис. 2, в приведена сканограмма ее электрофоретического распределения. При сравнении электрофоретической подвижности

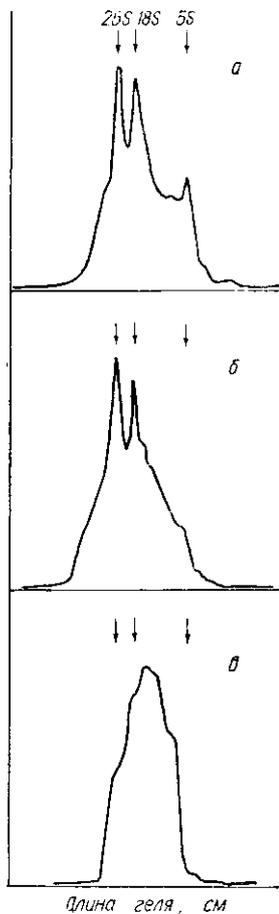
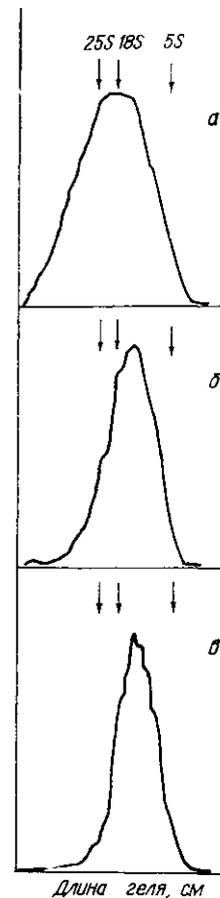


Рис. 1. Электрофоретический анализ фракционированной на бензоилированной целлюлозе РНК, выделенной из цитоплазматического экстракта после удаления полирибосом: а — нефракционированная РНК; б — несвязавшаяся с бензоилированной целлюлозой РНК; в — связавшаяся с бензоилированной целлюлозой мРНК.

Fig. 1. Electrophoretic analysis of RNA fractionated by benzoylated cellulose chromatography. RNA was isolated from cytoplasmic extract after removal of polyribosomes: а — unfractionated RNA; б — RNA not linked with benzoylated cellulose; в — mRNA linked with benzoylated cellulose.

Рис. 2. Электрофоретический анализ поли(А)+ мРНК (а), выделенной из полирибосом хроматографией на олиго(дТ)-целлюлозе; поли(А)- мРНК (б), выделенной из полирибосом хроматографией на бензоилированной целлюлозе; поли(А)- мРНК (в), выделенной из свободных цитоплазматических информосом.

Fig. 2. Electrophoretic analysis of poly(A)+ mRNA (а), isolated from polyribosomes by oligo(dT)-cellulose chromatography; poly(A)- mRNA (б), isolated from polyribosomes by benzoylated cellulose chromatography; poly(A)- mRNA (в), isolated from free cytoplasmic informosomes.



видно, что исследуемые фракции мРНК (рис. 2) не имеют существенных различий по молекулярно-весовым характеристикам и проявляют сходное гетерогенное распределение в области 8—23S.

Основным присущим мРНК свойством является их матричная активность в бесклеточной белоксинтезирующей системе. Нами проведены эксперименты по определению матричной активности исследуемых популяций мРНК. Результаты этих экспериментов отражены в таблице. Обращает внимание тот факт, что трансляционная активность поли(А)+ мРНК в несколько раз выше по сравнению с таковой поли(А)- мРНК. Более эффективная трансляция *in vitro* поли(А)+ мРНК может указывать на важную функцию поли(А) в процессе трансляции мРНК. Вместе с тем наблюдаемая нами и другими исследователями способность к трансляции поли(А)- мРНК свидетельствует о том, что наличие поли(А)-последовательностей не является строго необходимым условием для проявления матричной активности мРНК в бесклеточной системе синтеза белка. Возможно, что поли(А)-последовательности необходимы для поддержания высокой функциональной стабильности молекул мРНК [11].

Обнаруженные нами различия в эффективности трансляции цитоплазматических поли(А)+ и поли(А)- мРНК зародышей пшеницы являются, по-видимому, структурно-функциональной особенностью этих

Трансляционная активность мРНК полирибосом и свободных цитоплазматических информосом из прорастающих зародышей пшеницы
Translational activity of mRNA from germinating wheat embryos polyribosomes and free cytoplasmic informosomes

Популяции мРНК	Включение [³⁵ S] метионина в кислотонерастворимый продукт, имп/мин на 1 о. е. экзогенной мРНК
Поли(А) ⁺ мРНК полирибосом, выделенная хроматографией на олиго(dT)-целлюлозе	804413
Суммарная поли(А) ⁺ и поли(А) ⁻ мРНК из полирибосом, выделенная хроматографией на бензоилированной целлюлозе	347610
Поли(А) ⁻ мРНК, выделенная из внеполисомных цитоплазматических информосом хроматографией на бензоилированной целлюлозе	211650
Поли(А) ⁻ мРНК из полирибосом, полученная хроматографией на бензоилированной целлюлозе	272306

Примечание. Сравнение трансляционной активности различных мРНК проводили в нескольких независимых экспериментах. Абсолютные значения радиоактивности от эксперимента к эксперименту варьировали, однако соотношения между трансляционной активностью исследуемых мРНК сохранялись. В бесклеточную систему вносили такое количество мРНК, при котором обеспечивалось максимальное включение [³⁵S]метионина в кислотонерастворимый продукт и соблюдалась прямолинейная зависимость синтеза белка от количества вносимой мРНК.

мРНК и не связаны с их выделением и очисткой. Подтверждением этому служит более высокая по сравнению с поли(А)⁻ мРНК эффективность трансляции суммарной полирибосомной мРНК, выделенной хроматографией на бензоилированной целлюлозе. Повышенная эффективность трансляции обусловлена присутствием в этом препарате поли(А)⁺ мРНК.

В целом анализ трансляционной активности различных популяций мРНК показывает, что хроматография на бензоилированной целлюлозе является эффективным методом очистки биологически активной мРНК, не содержащей полиадениловых последовательностей и которую не удастся выделить фракционированием на олиго(dT)-целлюлозе. Очистка поли(А)⁻ мРНК на бензоилированной целлюлозе дает принципиальную возможность для исследования функциональных взаимоотношений между популяциями мРНК, содержащимися в составе полирибосом и свободных цитоплазматических информосом.

ISOLATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE POLY(A)⁺
AND POLY(A)⁻ mRNA FROM GERMINATING WHEAT EMBRYOS

N. G. Filimonov, A. O. Agashkin, O. D. Sablina, M. A. Aitkhozhin

Institute of Molecular Biology and Biochemistry,
Academy of Sciences of the Kazakh SSR, Alma-Ata

S u m m a r y

Biologically active poly(A)⁻ mRNA were isolated from polyribosomes and free cytoplasmic informosomes of germinating wheat embryos by benzoylated cellulose chromatography. Purified fractions of poly(A)⁻ mRNA of polyribosomes and free isoformosomes do not essentially differ from cytoplasmic poly(A)⁺ mRNA by molecular-weight characteristics and have translational activity in the cell-free system of protein synthesis. It is shown that poly(A)⁻ mRNA of polyribosomes and free informosomes equally stimulate incorporation of [³⁵S]methionine into acid-insoluble product, but the efficiency of their translation is much lower than that of poly(A)⁺ mRNA. The difference in the translation efficiency of cytoplasmic poly(A)⁺ and poly(A)⁻ mRNA of wheat embryos is obviously the metabolic peculiarity of these mRNA and is not related to their isolation.

1. *Ajtkhozhin M. A., Akhanov A. U., Doschanov Kh. I.* Informosomes of germinating wheat embryos // FEBS Lett.— 1973.—31, N 1.— P. 104—106.
2. *Ajtkhozhin M. A., Akhanov A. U.* Release of mRNP-particles of the informosome type from polyribosomes of higher plant embryos // Ibid.— 1974.—41, N 2.— P. 275—279.
3. *Spirin A. S., Ajtkhozhin M. A.* Informosomes and polyribosome associated proteins in eukaryotes // Trends Biochem. Sci.— 1985.—10, N 4.— P. 162—165.
4. *Филимонов Н. Г., Айтхожин М. А., Газарян К. Г.* Поли(А)-содержащие РНК из прорастающих зародышей пшеницы // Молекуляр. биология.— 1978.—12, № 3.— С. 552—556.
5. *Организация нуклеотидных последовательностей ядерной ДНК зародышей пшеницы* / Н. Г. Филимонов, Н. А. Мартакова, Л. С. Попов и др. // Биохимия.— 1982.—47, № 7.— С. 1198—1207.
6. *On the lability of poly(A)-sequences during the extraction of messenger RNA from polyribosomes* / R. P. Perry, J. La Torre, D. E. Kelley, J. R. Greenberg // Biochim. et biophys. acta.— 1972.—262, N 2.— P. 220—226.
7. *Маниагис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Выделение, очистка и анализ мРНК из эукариотических клеток // Методы генетической инженерии.— М.: Мир, 1984.— С. 186—204.
8. *The separation of soluble ribonucleic acids on benzoylated diethylaminoethylcellulose* / J. Gillam, S. Millward, D. Biew et al. // Biochemistry.— 1967.—6, N 10.— P. 3043—3056.
9. *Marcus A., Efron D., Weeks D. P.* The wheat embryos cell-free system // Meth. Enzymol.— 1974.—30.— P. 749—754.
10. *Roberts W. K.* Use of benzoylated cellulose columns for the isolation of poly(adenylic acid) containing RNA and other polynucleotides with little secondary structure // Biochemistry.— 1974.—13, N 18.— P. 3677—3682.
11. *Role of the polyadenylate segment in the translation of globin mRNA in Xenopus oocytes* / G. Huez, G. Marbaix, E. Hubert et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1974.—71, N 7.— P. 3143—3146.

Ин-т молекуляр. биологии и биохимии
АН КазССР, Алма-Ата

Получено 14.10.85

УДК 577.113.6:542.95

ПОЛНЫЙ АВТОМАТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ФОСФОТРИЭФИРНЫМ МЕТОДОМ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ НА СИНТЕЗАТОРЕ «ВИКТОРИЯ-4М»

**С. М. Грязнов, В. К. Потапов, В. В. Горн,
В. Ф. Зарытова, Ю. Г. Средин, Г. А. Потемкин, Э. А. Шабарова**

Разработка и использование автоматических синтезаторов олигодезоксирибонуклеотидов является логическим следствием прогресса, достигнутого в последние годы в области химического олигонуклеотидного синтеза [1, 2]. Работы по автоматическому твердофазному синтезу олигонуклеотидов, проводимые в нашей стране с начала 70-х годов в МГУ, СКТБ специальной электроники и аналитического приборостроения и Новосибирском институте биорганической химии СО АН СССР, завершились в настоящее время созданием синтезатора «Виктория-4М», результаты испытаний которого в различных вариантах триэфирной схемы в полностью автоматическом режиме описаны в настоящей статье.

Материалы и методы. В работе использовали TPS, полученный в Опытном химическом производстве Новосибирского института органической химии СО АН СССР; MeIm («Fluka», Швейцария); силикагель Kieselgel-60 («Merck», ФРГ); Kieselgel-RPTMS («Merck», ФРГ); тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинках Kieselgel-F₂₅₄ («Merck», ФРГ) в системах хлороформ — этанол (9 : 1, v/v) и ацетонитрил — вода (9 : 1, v/v); 5'-(п-хлорфенил-β-цианэтил)-фосфат-N-ацил-нуклеозиды,

Принятые обозначения: приставка d-(дезоксид-) везде опущена; TPS — 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид; MeIm — 1-метилимидазол, pN — 5'-p-(п-хлорфенил, β-цианэтил)-N-ацил-нуклеотид; ММТг — (п-метокси)-трифенилметил; ТМГ — тетраметилгуанидин; ТФУ — трифторуксусная кислота; ТБАФ — тетрабутиламмонийфторид.