

Л. В. Патер, В. А. Хрипунов, В. И. Прима

**МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ РНК
С ГУАНИДИНИЙТИОЦИАНАТОМ
И ВАКУУМНЫЙ ПЕРЕНОС НА МЕМБРАНЫ
УЛУЧШАЮТ ВОЗМОЖНОСТИ АНАЛИЗА
ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ТРАНСКРИПТОВ
ИЗ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ**

Предложен модифицированный метод выделения РНК из клеток животных с использованием гуанидинийтиоцианата, позволяющий получать высокомолекулярные препараты как из ядра, так и из цитоплазмы. Разработана схема быстрого переноса РНК под действием вакуума из геля агарозы после электрофоретического разделения на сорбирующие мембраны. Гибридизацией с радиоактивными зондовыми ДНК показана эффективность сочетания указанных подходов для анализа размеров и распределения транскриптов индивидуальных генов между ядром и цитоплазмой.

Введение. В исследованиях экспрессии генома на претрансляционном уровне широко используются методы, характеризующие размеры, количественный и качественный состав молекул РНК. Среди этих методов весьма информативны применяемые по отдельности или в различных сочетаниях электрофорез в гелях и гибридизация нуклеиновых кислот [1, 2]. Необходимым условием такого анализа является целостность используемых в эксперименте молекул ДНК и РНК. Для ДНК эта проблема хорошо изучена, подробно описаны методические приемы, гарантирующие качество результатов [1, 3]. Более сложными являются манипуляции с РНК ввиду меньшей ее устойчивости к нагреванию и РНКазам. Наша работа посвящена совершенствованию методов, щающих высокомолекулярную РНК на двух важных этапах ее анализа — при выделении из тканей эукариот и переносе на мембраны после электрофореза.

Материалы и методы. В основу выделения РНК положен гуанидинийтиоцианатный метод [4]. Все операции проводили на холоду с использованием стерильной посуды. Растворы сахарозы обрабатывали 0,1 %-ным диэтилпиноксикарбонатом. Исходный материал — печень белых крыс. Навеску ткани, замороженную жидким азотом, растирали в ступке и гомогенизировали в 10 объемах 2,5 %-ного раствора лимонной кислоты и 0,05 %-ного тритона X-100. Гомогенат фильтровали через 6—8 слоев марли. Фильтрат центрифугировали при 4000 g в течение 5 мин при 4 °С. К супернатанту, содержащему цитоплазматическую фракцию, добавляли 2,2 объема этанола и аммоний ацетат до концентрации 0,2 M и оставляли на 2 ч при —20 °С, после чего центрифугировали 30 мин при 4000 g (4 °С). Осадок, содержащий ядра, очищали от примесей цитоплазмы. Его ресуспендировали в 10 объемах раствора, содержащего 0,25 M сахарозу и 2,5 %-ную лимонную кислоту, с последующим центрифугированием при 4000 g в течение 10 мин при 4 °С. Полученный осадок ресуспендировали в 5 объемах того же буфера, суспензию наклоняли на равный объем раствора 0,88 M сахарозы, 2,5 %- лимонной кислоты и центрифугировали при 4000 g в течение 15 мин при 4 °С. Очищенные ядра и осажденную цитоплазматическую фракцию гомогенизировали в лизирующем буфере (4 M гуанидинийтиоцианат («Fluka», Швейцария), 10 mM ЭДТА, 50 mM трис-HCl, pH 7,6, 8 %-ный 2-меркаптоэтанол (по объему), 0,5 %-ный саркозил) из расчета 5 мл буфера на 1 г ткани. Гомогенат лизированных ядер пропускали через иглу для инъекций № 8 до снижения вязкости (8—10 раз) и дополнительно обрабатывали ультразвуком (20 кГц, 30 с, 0 °С). В дальнейшем суспендирование осадков при выделении ядерной РНК проводили только через иглу.

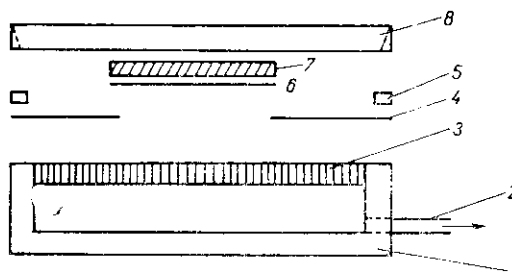
© Л. В. ПАТЕР, В. А. ХРИПУНОВ, В. И. ПРИМА, 1991

К лизатам обеих фракций добавляли по 7 объемов 4 М LiCl (по отношению к объему лизирующего буфера). Полученные смеси оставляли на 20 ч при 4 °С, после чего центрифугировали при 11 000 g в течение 1 ч при 4 °С. Осадки ресуспендировали в 3 М LiCl и центрифугировали в тех же условиях.

Следующим этапом очистки РНК явилась фенол-хлороформная обработка. Фенол насыщали буфером: 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 1 мМ ЭДТА. Хлороформ применяли в смеси с изоамиловым спиртом в соотношении 24 : 1.

Осадки, полученные в результате последнего центрифугирования в 3 М LiCl, ресуспендировали в буфере: 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 1 мМ ЭДТА, 0,1 % DS-Na (цитоплазму — в 15 объемах, ядра — в 5 объемах

Рис. 1. Схема аппарата для вакуумного переноса РНК: 1 — вакуумная камера; 2 — выход к насосу; 3 — пористая или перфорированная пластина; 4 — полиэтиленовая пленка; 5 — резиновое кольцо; 6 — сорбирующая мембрана; 7 — гель; 8 — бортик резервуара для элюирующей жидкости
Fig. 1. The scheme of apparatus for vacuum RNA transfer: 1 — vacuum chamber; 2 — vacuum inlet; 3 — porous plate; 4 — polythene film; 5 — rubber ring; 6 — adsorbing membrane; 7 — gel slab; 8 — reservoir for eluting fluid



по отношению к исходной навеске ткани). Суспензии последовательно экстрагировали при комнатной температуре в течение 15 мин равными объемами смесей: фенол — хлороформ (9 : 1), фенол — хлороформ (1 : 1) и очищали хлороформом. Центрифугирование проводили при 4000 g в течение 40 мин (при 4 °С). РНК, содержащуюся в водных фазах, осаждали этанолом. Поли(А)⁺РНК и поли(А)⁻РНК разделяли на колонке с олиго(dТ)-целлюлозой стандартным методом [1].

Качество РНК анализировали вертикальным электрофорезом в 1,7 %-ном геле агарозы, содержащем 6 М мочевины и буфер: 40 мМ трис, 36 мМ NaH₂PO₄, 1 мМ ЭДТА, рН 7,4 [5]. На дорожку геля толщиной 1 мм наносили до 10 мкг РНК в буфере геля, прогретой 5 мин при 65 °С. После разделения РНК гель промывали 15 мин в H₂O и затем либо окрашивали [1], либо переносили РНК на мембрану для последующей гибридизации с радиоактивным зондом.

Вакуумный перенос РНК на мембрану выполняли аналогично тому, как описано для ДНК [6, 7], но гель предварительно вымачивали 45 мин в 50 мМ NaOH, 10 мМ NaCl и нейтрализовали 45 мин в 0,1 М трис-НСl, рН 7,5 [1]. Схема аппарата для переноса изображена на рис. 1. Сборку аппарата производили в следующем порядке. На вакуумную камеру, служащую одновременно для сбора проходящей жидкости, накладывается полиэтиленовая пленка с вырезом по форме геля, но меньше его на 2—3 мм с каждой стороны. Вырез покрывается связывающей РНК мембраной (нитроцеллюлоза, нейлон или капрон с диаметром пор 0,2—0,4 мкм) и затем — гелем. Край полиэтиленовой пленки фиксируется резиновым кольцом, уплотняющим стык между вакуумной камерой и наложенным сверху бортиком. После стягивания аппарата зажимами сверху образуется резервуар для элюирующей жидкости, которая может переходить в вакуумную камеру только через гель и мембрану. С подключением аппарата к вакуумному или водоструйному насосу разность давлений вызывает ток жидкости, переносящей РНК из геля на мембрану. По завершении переноса аппарат разбирается, мембрана сушится током воздуха и фиксируется или запеканием в вакууме (нитроцеллюлоза) [1] или ультрафиолетовым облучением (капрон и нейлон) в течение 5—10 мин.

Контрольную гибридизацию РНК на мембранах проводили, как описано ранее [8], с использованием меченного P^{32} зонда, полученного в реакции обратной транскрипции с «рассеянной затравкой» [1] на матрице поли(А)-РНК крысы, или меченного P^{32} зонда, полученного в реакции ник-трансляции кДНК $B2^+mРНК_x$ [8].

Результаты и обсуждение. В последние годы широкое распространение получили методы выделения РНК, основанные на способности солей гуанидиния в высоких концентрациях разрушать комплексы нуклеопротеинов и тем самым блокировать эндогенную РНКазную активность клетки (см. [1] и [2]). Для этого растворы, содержащие гуанидинийтиоцианат или гуанидинийхлорид, добавляют уже на начальных этапах при разрушении клеток и ядер. Дальнейшая депротенинизация включает экстракцию фенолом или ультрацентрифугирование в градиенте плотности хлористого цезия. Таким образом, удается выделить интактные суммарные РНК из небольших количеств тканей или клеточных культур. Например, есть сообщение, что полученные этим путем препараты из печени в пять раз активнее при трансляции, чем мРНК, очищенная с помощью традиционного фенольного метода [9]. Однако к существенным недостаткам всех методов с применением солей гуанидиния можно отнести, во-первых, незначительную массу исходного материала для выделения, ограниченную высокой стоимостью реактивов и объемом пробирок для высокоскоростного центрифугирования. Во-вторых, они позволяют выделять только суммарные препараты РНК из клеточных гомогенатов.

Для того чтобы обойти вышеуказанные ограничения, мы в качестве первого этапа разделяли гомогенат ткани на ядерную и цитоплазматическую фракции, а затем (после осаждения их содержимого) переходили к лизису осадков в присутствии гуанидинийтиоцианата и депротенинизации нуклеиновых кислот в малом объеме. Это позволило получить препараты РНК высокого качества, о чем свидетельствуют результаты электрофореза в денатурирующих условиях (рис. 2).

Как видно из электрофореграммы, все препараты содержат неповрежденные 18S и 28S рибосомные РНК. По этому показателю суммарная РНК (дорожка 2), выделенная оригинальным методом [4], не отличается от цитоплазматической РНК (дорожка 3), выделенной по нашей модификации, и практически такая же, как суммарная РНК кролика (дорожка 6), выделенная фенольным методом [1]. Способ получения цитоплазматической РНК с помощью гуанидиния, ставший возможным благодаря примененному нами осаждению цитоплазматической фракции этанолом, не влияет на ее сохранность. Кроме того, такое осаждение позволяет перенести содержимое цитоплазматической фракции в раствор с другой величиной рН, при которой в дальнейшем обрабатывают данную фракцию. При последующем разделении цитоплазматической РНК на олиго(dT)-целлюлозе интактность фракций также сохраняется (см. дорожку 4), что указывает на высокую степень чистоты полученного препарата.

Наибольшие различия между вариантами методов выделения проявляются при сравнении ядерных РНК. Если оригинальный метод [4] применить к осадку ядер, то полученная РНК (дорожка 1), так же как и суммарная (дорожка 2), практически не содержит 45S-предшественника рРНК, но зато во многих случаях проявляет отчетливую полосу на старте дорожки, соответствующую клеточной ДНК. Предложенное нами сочетание ультразвука и продавливания через иглу при обработке ядерной фракции лизирующим раствором позволяет убрать примеси ДНК из препаратов РНК, при этом 45S РНК не повреждается (дорожка 5).

Следует, однако, заметить, что преимущества описанного метода не распространяются на низкомолекулярные РНК (менее 5S), так как они, видимо, утрачиваются при разделении нуклеиновых кислот цен-

трифугированием в 3 М LiCl. Это нужно учитывать при анализе содержания коротких транскриптов.

Приведенная выше методика дает возможность получать ядерную и цитоплазматическую РНК из больших количеств тканей. Из 10 г печени получали не менее 20 мг цитоплазматической и 0,5 мг ядерной РНК.

Перенос на мембрану осуществляли после ее электрофореза в таком же агарозном геле, содержащем 6 М мочевины, какой использова-

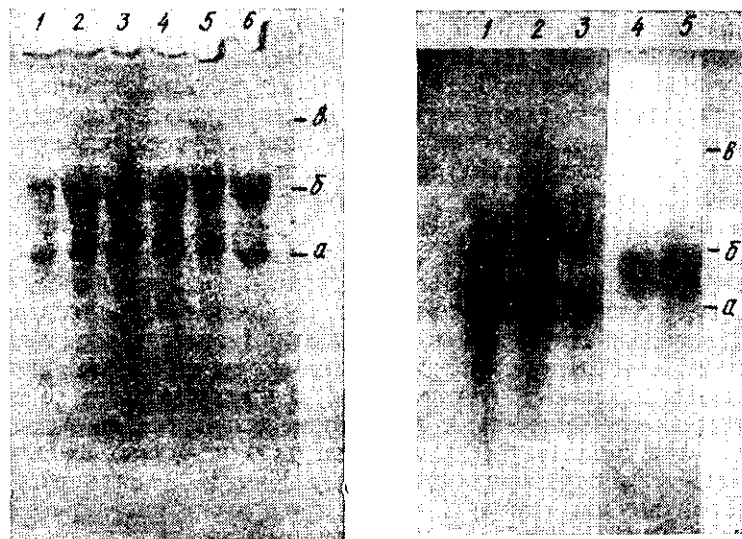


Рис. 2. Гель-электрофорез препаратов РНК, выделенных с использованием гуанидиний-тиоцианата из ядра и цитоплазмы клеток печени: 1 — ядерная РНК, выделенная оригинальным методом [4]; 2 — суммарная РНК, выделенная оригинальным методом [4]; 3 — цитоплазматическая РНК, выделенная модифицированным методом; 4 — то же после разделения на олиго(dT)-целлюлозе -- фракция поли(А)-РНК; 5 — ядерная РНК, выделенная модифицированным методом; 6 — контроль — суммарная РНК, выделенная фенольным методом [2]. После электрофореза гель окрашивали толуидиновым синим; а, б, в — соответственно 18S, 28S, 45S РНК

Fig. 2. Gel electrophoresis of RNA samples purified using guanidine thiocyanate from nuclei and cytoplasm of liver cells: 1 — nuclear RNA isolated by original method [4]; 2 — total RNA isolated by the original method [4]; 3 — cytoplasmic RNA isolated by the modified method; 4 — the same RNA after oligo(dT)cellulose fractionation — poly(A)RNA fraction; 5 — nuclear RNA isolated by the modified method; 6 — control — total RNA isolated by the phenol method [2]. After electrophoresis the gel is stained with toluidine blue; a, b, c — respectively 18S, 28S, 45S RNA, respectively

Рис. 3. Радиоавтография мембран с РНК после гибридизации с P^{32} -мечеными зондами ДНК: 1 — контроль — суммарная РНК, выделенная фенольным методом; 2 — ядерная РНК, выделенная модифицированным методом; 3 — цитоплазматическая РНК, выделенная модифицированным методом; 4 — то же; 5 — то же, поли(А)⁺фракция. Мембраны с дорожками 1-3 гибридизовали с P^{32} -кДНК к поли(А)-РНК цитоплазмы; мембраны с дорожками 4, 5 гибридизовали с P^{32} -кДНК к B2⁺мРНК; а, б, в — см. рис. 2

Fig. 3. The autoradiography of membranes with RNA after hybridization with P^{32} -labelled DNA probes; 1 — control — total RNA isolated by the phenol method; 2 — nuclear RNA isolated by the modified method, 3 — cytoplasmic RNA isolated by the modified method; 4 — cytoplasmic RNA isolated by the modified method; 5 — cytoplasmic RNA isolated by the modified method, poly(A)⁺ fraction. The membrane with slots 1-3 were hybridized with P^{32} cDNA for cytoplasmic poly(A)-RNA; the membranes with slots 4, 5 were hybridized with P^{32} -cDNA for B2⁺mRNA; a, b, c — see Fig. 2

ли для аналитических целей. Хотя в отличие от гелей, содержащих формальдегид, гидроксид метилртути или формамид [1], гели с 6 М мочевиной считаются не полностью денатурирующими, однако они нетоксичны, прочны, дают хорошее разрешение полос и стабильно воспроизводимые результаты [5].

Наиболее часто употребляемым методом переноса является капиллярный, при котором нуклеиновые кислоты элюируются из геля током жидкости, движимой капиллярными силами при пропитывании стопки

бумаги, наложенной на гель и мембрану [10]. Этот процесс растянут во времени на многие часы, что способствует деградации молекул и диффузионному размытию полос. Кроме того, высокомолекулярные нуклеиновые кислоты переносятся значительно хуже низкомолекулярных вследствие своей меньшей подвижности. Перечисленных недостатков лишен метод электропереноса [11], аналогичный электрофорезу, но он менее доступен из-за необходимости в мощных источниках электропитания и мембранах, способных связывать нуклеиновые кислоты при высокой ионной силе раствора. Как правило, этот метод применяется только для переноса ДНК, но не РНК.

В отличие от вышеуказанных недавно разработанный для ДНК метод вакуумного переноса [6, 7] не требует дорогой аппаратуры, универсален в отношении типов мембран и элюирующих растворов, обеспечивает быстрый и однородный перенос молекул всех размеров. Наша задача состояла в том, чтобы адаптировать условия вакуумного переноса для РНК. Как показали результаты различных проб, после электрофореза гель должен быть вымочен в дистиллированной воде для удаления избыточной мочевины, а затем подвергнут щелочной обработке. Частичный щелочной гидролиз, уменьшая размеры наиболее крупных молекул, улучшает их подвижность. Из использованных нами сорбирующих мембран наилучшими качествами (четкость отпечатка РНК, прочность его связывания, механическая прочность) обладают нейлоновые фильтры Hybond-N («Amersham», Англия), однако хорошие результаты были получены также на нитроцеллюлозных фильтрах BA-85 («Schleicher and Schull», ФРГ), а также на капроновых фильтрах экспериментальной лаборатории р/к «Хийу Калур» (Таллинн). Все эти типы мембран хорошо сорбируют РНК при элюции раствором $10\times$ SSC (1,5 М NaCl и 0,15 М NaCl₂COO). Как показывает окрашивание контрольных образцов геля до и после переноса, основная масса РНК переходит на мембрану уже через 30—40 мин после наложения вакуума.

Мы обычно проводили процесс 1—2 ч, стремясь поддерживать разрежение в камере на уровне около 0,05 атм (чтобы не деформировать гель), что способен обеспечивать даже водоструйный насос. Такое разрежение не создаст большой нагрузки на аппарат, поэтому его можно изготовить своими силами из пластмассы.

Конечный результат вакуумного переноса могут проиллюстрировать радиоавтографы мембран с РНК, гибридизовавшихся с радиоактивными зондами (рис. 3). При использовании в качестве Р³²-зонда кДНК, синтезированной на поли(А)-РНК из цитоплазмы клеток печени, т. е. в основном рРНК, на радиоавтографе видны пятна, соответствующие 18S, 28S, 45S РНК для препаратов из ядра (дорожка 2) или 18S, 28S РНК для препаратов из цитоплазмы (дорожка 3). При использовании в качестве Р³²-зонда клонированного фрагмента кДНК В2⁺мРНК_х наблюдается, как и следовало ожидать для индивидуальной последовательности, более четкая картина (дорожка 4, 5).

Таким образом, предложенные модификации методов выделения и переноса РНК на мембраны улучшают возможности определения относительного содержания транскриптов генов в ядре и цитоплазме. Это позволяет более тонко разграничить процессы, происходящие на претрансляционном уровне регуляции экспрессии генома, а именно: в ядре — образование и процессинг РНК; в цитоплазме — транспорт РНК, депонирование в информосомах, деградация.

Резюме

Запропоновано модифікований метод виділення РНК із клітин тварин з використанням гуанідинітїоціанату, що дозволяє одержувати високомолекулярні препарати як з ядра, так і з цитоплазми. Розроблена схема швидкого переносу РНК під дією вакууму з агарозного гелю після електрофоретичного розділення на сорбуючі мембрани. Гібридиза-

цією з радіоактивними зондами показана ефективність поєднання вказаних підходів для аналізу розмірів та розподілу транскриптів індивідуальних генів між ядром і цитоплазмою.

Summary

A modified method of RNA isolation in the presence of guanidine thiocyanate from the animal cells is suggested. The method permits the purification of high molecular weight samples from nucleus as well as from cytoplasm. The technique is also developed for quick RNA transfer using vacuum blotting from agarose gels to adsorbing membranes after electrophoretic separation of RNA. The efficiency of combination of the above two methods to analyze the size of individual gene transcripts and their distribution between the nucleus and cytoplasm is shown by hybridization of RNA blots with radioactive DNA probes.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маннатиш Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1985.— 479 с.
2. Транскрипция и трансляция. Методы / Под ред. Б. Хеймеа, С. Хиггинса.— М.: Мир, 1987.— 400 с.
3. Новое в клонировании ДНК. Методы / Под ред. Д. Гловера.— М.: Мир, 1989.— 368 с.
4. A method for isolation of intact translationally active ribonucleic acid / L. Cathala, L.-F. Savouret, B. Mencler et al. // DNA.— 1983.— 2, N 4.— P. 329—335.
5. Locker J. Analytical and preparative electrophoresis of RNA in agarose-urea // Anal. Biochem.— 1979.— 98, N 2.— P. 358—367.
6. Зайцев И. З., Яковлев А. Г. Вакуумный перенос ДНК на фильтры для выявления межиндивидуального полиморфизма методом «блоттинг»-гибридизации Саузерна // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1983.— 96, № 10.— С. 84—86.
7. Olszewska E., Jones K. Vacuum blotting enhances nucleic acid transfer // Trends Genet.— 1988.— 4, N 4.— P. 92—94.
8. Синхронные изменения концентраций *c-fos*-РНК и $B2^+$ мРНК_x в пререпликативном периоде регенерации печени у крыс / В. И. Прима, Т. А. Клочко, М. Ю. Оболенская и др. // Биополимеры и клетка.— 1989.— 5, № 6.— С. 83—86.
9. Raymond Y., Shore G. C. The precursor for carbamyl phosphate synthetase is transported to mitochondria via a cytosolic route // J. Biol. Chem.— 1979.— 254, N 19.— P. 9335—9338.
10. Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // J. Mol. Biol.— 1975.— 98, N 3.— P. 503—517.
11. Bittner M., Kupferer P., Morris C. F. Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzylmethyl cellulose or nitrocellulose sheets // Anal. Biochem.— 1980.— 102, N 3.— P. 459—471.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 05.09.90

УДК 577.112.5:578.841

Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак, Н. В. Роднин,
С. А. Атепалихина, Л. И. Пальчиковская

ВЫЯСНЕНИЕ ПОЛНОЙ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПОЛИЭДРИНА ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА (ВЯП) ОЗИМОЙ СОВКИ (AGROTIS SEGETUM) И УТОЧНЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ПОЛИЭДРИНОВ ВЯП ТУТОВОГО (BOMBYX MORI), НЕПАРНОГО (PORTHETRIA DISPAR) ШЕЛКОПРЯДОВ И БОЛЬШОЙ ВОЩИНОЙ МОЛИ (GALLERIA MELLONELLA)

Реконструирована полипептидная цепь полиэдрина ВЯП *A. segetum* путем выяснения строения триптических пептидов этого белка и сравнения их с известной аминокислотной последовательностью полиэдрина ВЯП *B. mori*. В дополнение к ранее опубликован-

© Э. А. КОЗЛОВ, Т. Л. ЛЕВИТИНА, Н. М. ГУСАК, Н. В. РОДНИН,
С. А. АТЕПАЛИХИНА, Л. И. ПАЛЬЧИКОВСКАЯ, 1991