

Р. А. ЗАХАРЯН, А. А. БАЕВ

АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НА КОЛОНКАХ ПРЕПАРАТОВ ТРАНСПОРТНОЙ РИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Транспортные («растворимые», адапторные) РНК (тРНК*) участвуют в белковом синтезе, выполняя функцию адапторов, существование которых постулировано гипотезой Крика Хогленда. Функциональные свойства тРНК определяются особенностями ее химического строения, и поэтому естественно стремление искать разгадку функций тРНК на путях изучения ее структуры, прежде всего первичной. Эта задача всегда казалась выполнимой, если учесть низкий молекулярный вес тРНК, возможности получения гомогенных препаратов и наличие в ее составе минорных нуклеотидов, существенно расширяющих средства анализа первичной структуры. И действительно, Холли и др. [1] недавно удалось расшифровать первичную структуру аланиновой тРНК. Аналогичные исследования ведутся и в Институте молекулярной биологии АН СССР [2] с валиновой тРНК дрожжей.

Препараты тРНК, предназначенные для анализа первичной структуры, физико-химических и некоторых случаев функциональных исследований, должны удовлетворять определенным, иногда очень жестким требованиям чистоты. Обычные примеси в недостаточно очищенных препаратах тРНК — это белки, ДНК, высокополимерная РНК, низкомолекулярный нуклеотидный материал и полисахариды. Многие из этих примесей без труда устраняются с помощью существующих препаративных методов, и в принципе тРНК можно получить в чистом виде.

Другой аспект проблемы, о котором идет речь далее, это эффективные способы контроля чистоты препаратов тРНК. Пользуясь соответствующими качественными, а при надобности и количественными реакциями, удается относительно легко установить наличие белка, ДНК и полисахаридов. Труднее определить присутствие в препарате тРНК высокополимерной РНК, так как в этом случае не может быть использован ни один из химических методов. В этом случае приходится ориентироваться на физико-химические методы контроля, и такие способы, как ультрацентрифугирование, гельфильтрация на сефадексе, колонки МАК, ионообменники и некоторые другие приемы могут дать удовлетворительные результаты.

Для определения примеси высокополимерной РНК в препаратах тРНК нами были испытаны с положительным результатом колонки

* Принятые сокращения тРНК — транспортная («растворимая», адапторная) РНК; вРНК — высокополимерная РНК, АЭ — целлюлоза-аминоэтилцеллюлоза.

МАК и аминоэтилцеллюлоза. В ходе этих исследований был разработан способ получения суммарной тРНК печени мышей. Это и составляет предмет настоящей статьи.

Методы. Получение суммарной тРНК. Суммарную тРНК пекарских дрожжей получали фенольно-цетавлоновым методом, описанным А. Д. Мирзабековым и др. [4]. Этот способ основан на непосредственной экстракции тРНК из неразрушенных клеток по Монье и др. с последующей депротеинизацией экстракта водонасыщенным фенолом по Керби [12]. Существенную роль в процедуре выделения играет осаждение тРНК цетавлоном, предложенное для этой цели Обель-Садрон и др. [8] и Джонсом [10].

Реактивы. Бромид цетилтриметиламмония (цетавлон) производства «Chemapol» (Чехословакия).

Сорбенты и ионообменники. Аминоэтилцеллюлоза фирмы «gec Lawson» (Англия), емкость 0,35 экв/г сухого веса; ее обработку производили по Петерсону и Соберу [14]. Колонку метилированного альбумина, сорбированного на селите (МАК), готовили по прописи Мандель и Херши [13]; альбумин бычий фирмы «gec Lawson» (Англия); селит—503 нмп.

Приборы и количественные методы. Концентрацию тРНК определяли с помощью спектрофотометра СФ-4 в 0,1 М NaCl; 0,03 М трис-HCl = буфер pH 7,1, считая $E_{260}^{1\text{ см}} = 240$ оптич. единиц. Кривые плавления тРНК снимали на СФ-4 с термостатированной приставкой и термометром, погруженной в исследуемый раствор. Седиментационный анализ проводили на центрифуге УЦПА-1; тРНК растворяли в 0,1 М NaCl—0,03 М трис-HCl—буфере pH 7,1.

Результаты и обсуждение. Получение суммарной тРНК из печени мышей. Фенольная депротеинизация по Керби стала теперь обычным приемом при получении нуклеиновых кислот. Менее распространено в препаративной химии нуклеиновых кислот применение четвертичных аммониевых оснований (к которым относится цетавлон), хотя на этой основе были разработаны способы получения тРНК из пекарских дрожжей [2, 4] и из животных тканей [9]. Четвертичные аммониевые основания позволяют отделять тРНК от солей, низкомолекулярных и высокомолекулярных соединений, если последние не имеют характера полианионов. Цетавлоновые соли тРНК растворимы в спиртах, диметилформамиде и других растворителях, что имеет значение при проведении химических реакций в неводной среде и при некоторых физических исследованиях [6]. Цетавлоновые соли тРНК полностью недоступны действию РНКазы и удобны для длительного хранения. Недостаток цетавлона заключается в том, что он осаждает не только тРНК, но и другие полианионы — ДНК, высокополимерную РНК, кислые полисахариды и отчасти белки. Теоретически можно осуществить разделение цетавлоновых солей всех этих полианионов, используя то обстоятельство, что они обладают различными «критическими» солевыми концентрациями, при которых цетавлоновые комплексы переходят в раствор. Полностью это свойство цетавло-

новых нуклеиновых кислот никогда не было использовано, хотя такая попытка была сделана Брауном и др. [9]. Особенно легко удастся освободиться этим способом от кислых полисахаридов, цетавлоновые производные которых растворяются при низких концентрациях солей. Это нашло применение в способе Мирзабекова и др. [4], а также в описываемом ниже методе. Практически белки и ДНК отделяются при обработке цетавлоном, а для отделения тРНК от высокополимерной РНК приходится прибегать к солевому фракционированию.

Суммарную тРНК печени мышей получали следующим образом.

Печени мышей, извлеченные сразу же после забоя животных и охлажденные в ледяной воде, гомогенизировали с 100 мл 0,15 М раствора NaCl на 20 г ткани в течение 5 мин. при охлаждении в гомогенизаторе типа Уоринга. Добавляли 100 мл водонасыщенного фенола pH 6,7 и встряхивали в течение 40 мин. После центрифугирования 30—40 мин. $g \times 4000$ водную фазу отбирали и депротенизировали повторно тем же водонасыщенным фенолом (1 объем от водной фазы). Затем к отобранной водной фазе добавляли 1/10 объема 20%-ного ацетата калия pH 5 и 2 объема этилового спирта. Полученный центрифугированием осадок растворяли в 10 мл воды, нерастворяющуюся часть отбрасывали и к полученному раствору добавляли 6 мл раствора цетавлона 50—60 мг/мл. Последний, как было сказано, осаждает также белки, кислые полисахариды, высокополимерную РНК, ДНК, пигменты. Поэтому приходится добавлять некоторый избыток цетавлона по отношению к содержанию тРНК. Обычно при отработке процедуры осаждения оптимальное количество цетавлона устанавливают титрованием обрабатываемой вытяжки раствором цетавлона.

В случае печени мышей добавляют 4-кратное весовое количество цетавлона по отношению к тРНК, т. е. 180—200 мг на 10 г печени. В мутную жидкость добавляют 5 М NaCl до конечной концентрации 0,03—0,05 и получают хорошо сформированный осадок цетавлоновой соли РНК в прозрачную надосадочную жидкость. Можно поступить и как в другом способе [4], т. е. растворить осадок после спиртового осаждения в 0,3 М NaCl, а затем добавить раствор цетавлона.

Осадок оставляют на 1 час при комнатной температуре, отделяют центрифугированием, тщательно удаляя жидкость, и затем растворяют в 96%-ном этиловом спирте (можно при умеренном подогревании). В случае надобности центрифугируют и к раствору добавляют 1/5 объема 5 М NaCl, выпадает осадок. Для удаления следов цетавлона осадок растворяют в 2 М NaCl и осаждают 3 объемами 96%-ного этанола, повторяя эти процедуры 3—4 раза.

Затем проводят освобождение от высокополимерной РНК. Для этого осадок трижды встряхивают с 1 М NaCl при 4° в течение 30—40 мин. Можно поступить и иначе. Осадок растворяют в дистиллированной воде (35—50 мг тРНК/мл) и добавляют равный объем 2 М NaCl, оставляют на ночь при 4°.

Осадок высокополимерной РНК отделяют центрифугированием, а тРНК осаждают добавлением к надосадочной жидкости этанола. Центрифугируют и осаждают тРНК, добавляя и объединенную надосадочную жидкость 1/10 объема CH_3COOH pH 5 и 2,0 объема 96%-ного этанола.

Для обессоливания, удаления возможных примесей пигментов и т. п. раствор тРНК пропускают через сефалекс G-25, проводят элюцию водой и лиофилизируют.

Описанный способ пригоден для получения тРНК из печени крысы, кролика.

Аналитическое разделение суммарной тРНК на колонках. Как было сказано выше, нами была поставлена задача проверить практически пригодность разделения суммарного препарата тРНК на колонках для определения примеси вРНК. Возможность разделения нуклеиновых кислот на колонке МАК и целлюлозных ионообменниках не пуждалась, конечно, в доказательствах, так как это было показано ранее. Речь шла о том, можно ли таким путем установить присутствие в препаратах тРНК небольших количеств вРНК и разработке практических деталей метода.

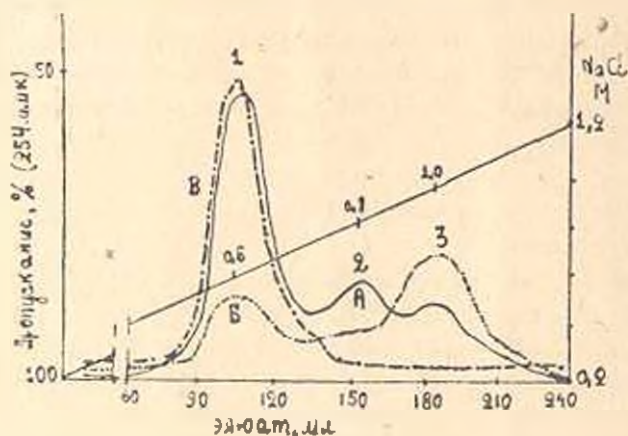


Рис. 1. Хроматографическое разделение тРНК дрожжей на колонке МАК. А — препарат тРНК, выделенный фенольным способом с осаждением цетавлоном без фракционирования NaCl ; Б — смесь тРНК и высокополимерной РНК; В — препарат тРНК после 3-кратного фракционирования 1 М NaCl при концентрации тРНК 35—40 мг/мл. 1) пик тРНК; 2 и 3) пики высокополимерной РНК. Колонка МАК 8×2 см; сорбировано от 1 до 1,5 мг препарата; линейный градиент 0,2 м — 1,2 М NaCl в 0,05 М фосфатном буфере pH 6,7, объем элюента 240 мл, скорость подачи 30 мл/час, запись на „Универсоре“ ЛКВ.

На рис. 1 показан профиль разделения на колонке МАК тРНК, полученной фенол-цетавлоновым методом из пекарских дрожжей без фракционирования NaCl (кривая А). После пика, соответствующего тРНК (0,6 М NaCl), получены еще два небольших пика, которые, судя

по положению (0,8 и 1,0 NaCl), отвечают двум обычным пикам вРНК (рибосомальной). Приведенный на рис. 1 профиль несколько отличается от разделения на колонке МАК суммарных лукленновых кислот [5, 8]: между пиками тРНК и вРНК отсутствует отчетливый интервал, нет пика ДНК. Различие объясняется несколько более крутым градиентом NaCl, шириной пика тРНК, которая преобладает в препарате, и, возможно, некоторой деградацией вРНК. Во всяком случае, смесь очищенной тРНК с вРНК (очищенный переосаждением препарат дрожжевой РНК, фирмы «Reanal») дал очень похожий профиль с тремя пиками (рис. 1, кривая Б). Троекратное осаждение раствора тРНК 1 М NaCl, которое согласно [15] высаливает РНК, освобождает тРНК от высокополимерных примесей — и хроматографический профиль таких препаратов дает только один пик, соответствующий тРНК, лишняя раз подтверждая эффективность этого приема. Тот же результат получают при экстракции осадка после цетавлонового осаждения 1 М NaCl (описано выше).

Для обнаружения присутствия вРНК в препаратах тРНК была испытана также аминоэтилцеллюлоза в OH- и Cl-формах.

При использовании целлюлозы в OH-форме (даже при условии эквilibрования с начальным элюентом) происходит некоторое подщелачивание элюента по мере повышения концентрации NaCl, вследствие обмена OH- на Cl-. В случае недостаточной буферной емкости элюента вытеснение OH- может вести к сдвигу пика, соответствующего тРНК, и недостаточно строгой стандартности анализа.

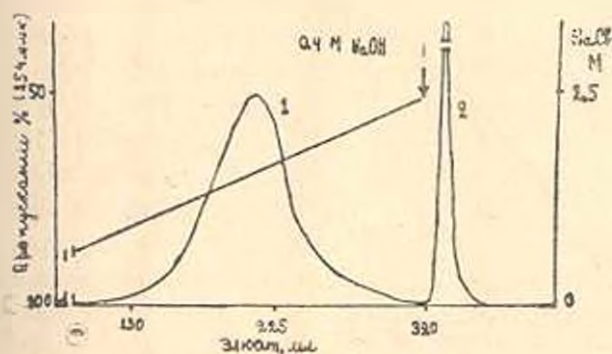


Рис. 2. Хроматографическое разделение смеси тРНК и высокополимерной РНК дрожжей на АЭ-целлюлозе (OH-форма). 1) тРНК; 2) высокополимерная РНК. Колонка $15 \times 0,8$ см. нанесено 2 мг тРНК и 1 мг высокополимерной РНК; линейный градиент 0—2,5 М NaCl (0,025 М фосфатный буфер pH 7,8); объем элюента 320 мл, скорость подачи 30 мл/час; запись на „Универде“ 1.КВ.

Поэтому было сочтено целесообразным переводить АЭ-целлюлозу в Cl-форму длительным промыванием колонки 3 М раствором NaCl и использовать в качестве элюента 0,02 М трис-хлоридный буфер pH 7,2, который имеет общий анион с ионообменником, вместо обычного фосфатного буфера. Пробу на полноту замещения OH-групп ионами Cl можно

проводить, пропуская через колонку 0,05 М раствор NaCl, освобожденный кипячением от растворенной CO_2 . При полном замещении OH-групп pH раствора NaCl после пропускания не сдвигается. В хлоридной форме целлюлозы для элюции тРНК нужны меньшие концентрации NaCl, чем в OH-форме: тРНК снимается с АЭ-целлюлозы в OH^- -форме, 1,0 М NaCl (0,025 М фосфатный буфер pH 7,8), в Cl^- -форме—0,75 М NaCl



Рис. 3. Кривая «назвещения» тРНК дрожжей, 1) 0,01 мг тРНК в 0,03 М трис-HCl pH 7,1; 0,1 М NaCl. 2) 0,01 мг тРНК в 0,03 М трис-HCl pH 7,1; 0,1 М NaCl и 0,01 м MgCl_2 .

(в обоих случаях этой концентрации соответствует начало пика). Типичное разделение тРНК (в смеси с вРНК) на колонке с АЭ-целлюлозой (ОН-форма) показано на рис. 2. NaCl не снимает вРНК при нейтральной реакции, для этого необходима щелочная реакция, поэтому обычно вРНК снимали 0,4 н. NaOH.

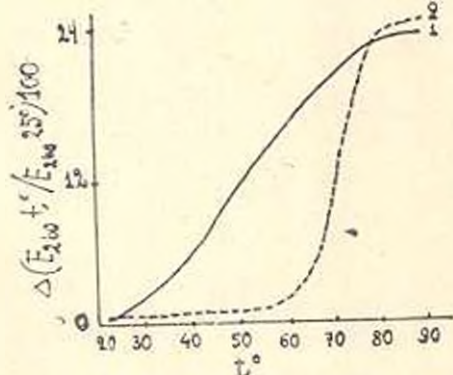


Рис. 4. Седиментограмма тРНК дрожжей. Ультрацентрифуга УЦПА-1 60000 об/мин., 18°, штиреровская оптика, снимки сделаны через 15, 20, 10 и 15 и 15 мин.; раствор 7 мг/мл тРНК в 0,03 М трис-HCl—pH 7,1—0,1 М NaCl.

Концентрация NaCl, при которой наступает десорбция тРНК с АЭ-целлюлозы, зависит от pH элюента—чем выше pH, тем ниже необходимая для этого концентрация NaCl. Это видно из следующего ряда, где первая цифра каждой пары—pH, вторая—концентрация NaCl, при которой заканчивается элюция тРНК: 7,2—2,8; 7,8—2,5; 8,2—2,3; 9,2—1,8. Емкость АЭ-целлюлозы составляет 15 мг тРНК на 1 г ионообменника. Таким образом АЭ-целлюлоза, как и колонка МАК, может быть использована для определения вРНК в препаратах тРНК. Вероятно, АЭ-целлюлозу можно использовать для препаративных целей, как и ДЭАЭ-целлюлозу.

Проведенные определения показали, что даже при получении тРНК из неразрушенных дрожжевых клеток экстрагируется часть вРНК, тем более это происходит при разрушении клеток механическим способом, осмотическим шоком или, скажем, действием лизоцима на бактерии.

Осаждение вРНК 1 М NaCl при правильном проведении дает хорошие результаты, но оно требует соблюдения ряда условий, касающихся, например, концентрации вРНК, и может быть неэффективным при небольшом содержании последней. Поэтому определение примеси вРНК является разумной мерой предосторожности.

Препарат тРНК пекарских дрожжей до фракционирования 1 М NaCl содержал около 15% РНК (это было отмечено также в [7]), после фракционирования эта примесь более не обнаруживалась. В таких препаратах нельзя было установить присутствие белка, полисахаридов, ДНК. Седиментация в ультрацентрифуге (рис. 3) указывает на гомогенность препарата; пик тРНК соответствует $S_w = 4$ S. Кривые „плавления“ тРНК в 0,03 М трис-HCl буфере pH 7,1—0,1 М NaCl с $MgCl_2$ и без него (рис. 4) соответствуют таковым чистых препаратов. Нуклеотидный состав такой тРНК (в частности содержание минорных компонентов) равным образом свидетельствует о высокой чистоте препаратов.

Аналогичные данные, касающиеся примеси вРНК, получены с тРНК печени крысы.

В ы ы о д ы

Фенол-цетавлоновый метод пригоден для получения тРНК из печени мышей и крыс. Примеси высокополимерной РНК в препаратах тРНК не могут быть обнаружены химическими методами и приходится прибегать к физическим способам выявления высокополимерных компонентов. Для этой цели применены колонка МАК и хроматография на АЭ-целлюлозе: оба способа позволяют уверенно обнаруживать примеси вРНК в препарате тРНК. Фракционирование 1 М NaCl дает препараты тРНК, свободные от высокополимерной РНК, которые в тРНК, полученной из дрожжей, могут достигать 15%.

Институт молекулярной
биологии АН СССР, Москва

Поступило 6.IX 1965 г.

Ю. И. ДУБОВИЦКИЙ, В. И. РАКИ

ՏՐԱՆՍԴՈՐԱՅԻՆ ՌԻՐՈՆՈՎԵՐԵԱԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՊԱՏՐԱՍՏՈՒՆՆԵՐԻ ԱՆԱԼԻՏԻԿ
ՍՅՈՒՆԱՅԻՆ ԽՐՈՄԱՏՈԳՐԱԿՅԱՆ

Ա. Վ Ի Ն Փ Ն Ն Մ

Հողվածում նկարագրված է մկների և առնետների լյարդից տարրեր
արանպորտային սիրոնուկլեինաթթուների (տՐՆԿ) ստացման ֆենոլցետավո-
նային մեթոդը: տՐՆԿ-ի պատրաստուկներում բարձր պուրիմերային ՌՆԿ-ի
առկայությունը որոշելու համար որպես էֆեկտիվ միջոց հեղինակներն օգտա-
պատվել են սելիտի վրա սորրցված մեթիլացված ալբումինի սլունը (ՄԱՍ):

նույն նպատակի համար մշակված է խրոմատոգրաֆիա ամինոէթիլ-ցելուլոզայի վրա: Այս մեթոդը փոխարինում է լրացնում է մեթիլացված ալբումինի սյան և հստակապես էֆեկտիվ է պրեպարատիվ նպատակների համար:

Յույց է արված, որ ամին-ի պատրաստումները, որոնք ստացվել են խմորասնկերից Կերրիի ֆենոլային մեթոդով, պարունակում են մինչև 15% բարձր պոլիմերային ՌՆԿ:

Նկարագրված ֆենոլ-ցետալոնային մեթոդի և աղային ֆրակցիոնացման ղուգսրդումը հնարավորություն է տալիս ստանալու բարձր աստիճանի մաքրության ամին-ի պատրաստումներ:

ЛИТЕРАТУРА

1. Баев А. А., Вейкстери Т. В., Мирзиебеков А. Д., Крутилина А. И., Ли Л., Акселе-род В. Д. Труды Второй конференции по нуклеиновым кислотам, М., 1965.
2. Будовский Э. И., Грачев М. А. Вопросы медицинской химии, 10, 131, 1964.
3. Крутилина А. И., Захарян Р. А. Тезисы I-го Всесоюзного биохимического съезда, вып. II, 75, 1963.
4. Мирзиебеков А. Д., Вейкстери Т. В., Баев А. А. Биохимия, в печати, 1965.
5. Робертс Р. Б., Бриттен Р. И., Мак-Картн Б. И. В кн. Молекулярная генетика, М., 1964, с. 360.
6. Зветков В. Н., Киселев Л. Л., Фролова Л. Ю., Любина С. Я., Клеини С. И., Никитин Н. А., Сквозка В. С. Биофизика, 9, 257, 1964.
7. Фролова Л. Ю., Киселев Л. Л. Биохимия, 28, 722, 1963.
8. Aubel-Sadron G., Beck G., Ebel J. P., Sadron Ch. Biochim. Biophys. Acta, 42, 542, 1960.
9. Brown G. I., Kozinski Z., Cair C. In Acides Ribonucléiques et Polynucleotides, Paris, 1962, p. 183.
10. Jones A. S. Biochim. Biophys. Acta, 10, 607, 1953.
11. Holley R. W., Argat J., Everett G. A., Madison J. T., Marquissee M., Mettill S. H. Science, 347, 1462, 1965.
12. Kirky K. S. Biochem. J., 64, 105, 1956.
13. Mandel J., Herschey A. D. Analytical Biochem., 1, 66, 1960.
14. Peterson E. A., Sober H. A. In "Method in Enzymology" NY a. London, 1962, vol. V, p. 3.
15. Smith K. C. Biochim. Biophys. Acta, 40, 360, 1960.