

## ІНДИВІДУАЛЬНІ ІЗОАКЦЕПТОРНІ ТИРОЗИНОВІ тРНК ІЗ ПЕЧІНКИ БИКА. ВИДІЛЕННЯ І ХАРАКТЕРИСТИКА

Комбінацію двох хроматографій на колонках з БД-целюлозою у присутності та за відсутністю іонів магнію, а також подальшу очистку за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі (7 %) в 7 М сечовині було використано для виділення індивідуальних ізоакцепторних тирозинових тРНК із печінки бика високого ступеню чистоти. Із застосуванням методів гель-секвенування визначено первинну структуру (за виключенням міnorних основ) тРНК<sup>Tyr</sup>, яка виявилася ідентичною первинній структурі тирозинової тРНК<sub>Q</sub>.Ψ<sub>A</sub> із печінки бика.

Структурно-функціональні дослідження тРНК із еукаріотичних організмів пов'язані з труднощами одержання у достатніх кількостях гомогенного полінуклеотидного матеріалу. Для очистки ізоакцепторних тРНК тварин, як правило, використовують багатостадійні схеми очистки, які в підсумку призводять до низького виходу індивідуальних препаратів [1].

У цій роботі індивідуальні препарати ізоакцепторних тирозинових тРНК із печінки бика виділяли комбінацією двох хроматографій на колонках з БД-целюлозою і подальшою очисткою за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ, 7 %) у 7 М сечовині.

**Матеріали і методи.** У роботі використано наступні реактиви: БД-целюлозу, натрієву сіль АТФ («Serva», ФРН); <sup>14</sup>C-тирозин (питома активність 13320 МБк/ммоль, «Chempol», Чехія); MgCl<sub>2</sub>, 2-меркаптоетанол («Merck», ФРН); NaCl, осч, а також [γ-<sup>32</sup>P]-АТФ з питомою активністю 40 ПБк/ммоль («Радіопрепарат», ІЯФ АН Узбекистану), лужну фосфатазу *Escherichia coli* (КФ 3.1.3.1, «Worthington», США), T1-РНКазу (КФ 2.7.1.78), виділену із *E. coli*, інфікованої фагом T4 («Pharmacia», Швеція).

Препарат сумарної тРНК отримано за методом Брунграбер [2]. Суміш аміноацил-тРНК снйетаз (АРСаз) виділяли із печінки бика по [3].

За допомогою комбінації двох хроматографій на колонках з БД-целюлозою [4] та подальшої очистки електрофорезом у ПААГ (7 %) в 7 М сечовині було одержано індивідуальні препарати ізоакцепторних тирозинових тРНК із печінки бика.

Акцепторну активність тРНК<sup>Tyr</sup> визначали за рівнем утворення <sup>14</sup>C-тирозил-тРНК у надлишку ферменту в умовах реакції аміноацилювання [1].

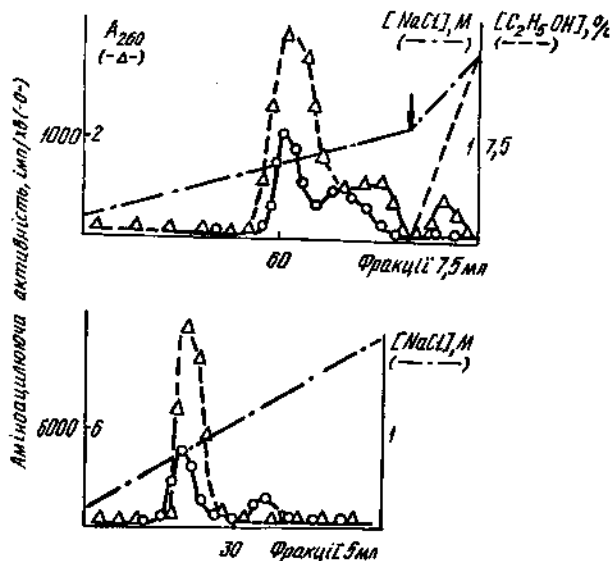
тРНК<sup>Tyr</sup> мітили по 5'-кінцевих залишках у відповідності з роботою [5]. Специфічну хімічну деградацію полінуклеотидного ланцюга тРНК проводили щодо кожного з чотирьох нуклеотидів [6], а також було здійснено специфічну деградацію міченої тРНК T1-, U2-, *Phy-M*-РНКазами та РНКазою із *Bacillus cereus* [7].

Електрофорез отриманих фрагментів проводили в 12,5 %-му ПААГ (0,02×30×60) у 8,5 М сечовині при 2500 В.

Авторадіографію здійснювали за температури —40 °С.

**Результати і обговорення.** Препарати індивідуальних ізоакцепторних тирозинових тРНК із печінки бика виділяли комбінацією двох хроматографій на колонках з БД-целюлозою і подальшою очисткою за допомогою електрофорезу в ПААГ (7 %) у 7 М сечовині.

При хроматографії 100 мг сумарного препарату тРНК печінки бика на колонці (2×20 см) з БД-целюлозою при 4 °С тРНК елюювали із швидкістю 8 мл/год в градієнтах концентрацій 0,2—1,0 М NaCl (1 л) і 1,0—2,0 М NaCl з градієнтом етанолу від 0 до 15 % (200 мл) в буфері: 10 мМ ацетат натрію, рН 4,5, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ 2-меркаптоетанол. В межах першого градієнта проходила елюція більшої частини



Хроматографії на БД-целюлозі 100 мг сумарної тРНК із печінки бика (колонка 2×20 см) (а) та 15 мг тРНК<sup>Тур</sup> у відсутності іонів магнію (колонка 1×10 см) (б)

тРНК. При хроматографії сумарного препарату тРНК печінки бика в даній системі одержано два піки тирозил-акцепторної активності. Фракції, які містили перший пік (30 мг), об'єднували і осаджували спиртом (тРНК<sup>Тур</sup>) (рисунок, а).

15 мг тРНК, яка містила тирозил-акцепторну активність, рехроматографували вдруге на колонці (1×10 см) з БД-целюлозою у відсутності іонів магнію при 4 °С. тРНК елюювали із швидкістю 6 мл/год в градієнті концентрацій 0,2—2,0 М NaCl (300 мл) та в 2,0 М NaCl з градієнтом етанолу від 0 до 10 % (50 мл) в буфері: 10 мМ ацетат натрію, рН 4,5, 1 мМ 2-меркаптоетанол. В межах градієнта концентрацій хлориду натрію виходили два піки тирозил-акцепторної активності. Фракції, які містили перший пік, об'єднували (10 мг) і осаджували спиртом (рисунок, б). В межах градієнта етанолу тирозил-акцепторної активності не спостерігалось, а в то й же час виявлялася серил-акцепторна активність, як у роботі [4].

Далі препарат тРНК<sup>Тур</sup> доочищували електрофорезом в 7 %-му ПААГ у 7 М сечовині. В результаті такої схеми очистки одержали препарати індивідуальних тРНК<sup>Тур1</sup> і тРНК<sup>Тур2</sup> 90 %-ї чистоти.

Крім вищевказаної схеми очистки, існують інші, за допомогою яких одержують аналітичні кількості індивідуальних препаратів тРНК. Як відомо, тРНК<sup>Тур</sup> із клітин ссавців містить β-D-галактопіранозу в складі мінорної основи (Q), що займає wobble-положення. Автори [8] одержали афінну колонку фіксуванням аглютиніну (лектину з бобового *Ricinus communis*) на агарозній колонці через достатньо довгий спейсер (біля 10 Å) і в результаті одноразового пропускання відділили тРНК<sup>Тур</sup> від усіх інших (тобто одержали індивідуальну фракцію майже 100 %-ї чистоти).

Аналогічний прийом було застосовано при виділенні тРНК<sup>ASP</sup> із дрозоділи: на колонці із конковалін-сефарозою одна із акцепторних фракцій, що містить Q, збагачується до акцепторної активності 1500 пмоль/A<sub>260</sub> [9]. Оскільки ця колонка має вибірку спорідненість до манози, автори вважають, що в тРНК<sup>ASP2</sup> у wobble-положенні міститься тап-Q.

Для очистки Q-вмісних тРНК (тРНК<sup>ASP</sup>, тРНК<sup>ASP</sup>, тРНК<sup>HIS</sup>, тРНК<sup>Tyr</sup>) можна використати іншу властивість мінору — здатність окислятися під дією перйодату натрію, що призводить до утворення гідрофобної піральної кільцевої структури. тРНК, які містять цю групу, міцніше затримуються на колонках (RPC-5, бензолъована ДЕАЕ-целюлоза), що дозволило виділити тРНК<sup>Tyr1</sup> із дрозоділи у високоочищеному стані [10].

Первинну структуру тРНК<sup>Tyr1</sup> із печінки бика розшифровували із застосуванням метода швидкого гель-секвенування. Секвенування проводили за розробкою Д. Пітті, що ґрунтується на специфічній хімічній деградації полінуклеотидного ланцюга по кожному з чотирьох нуклеотидів. Для секвенування також використовували гідроліз T1-, U2-, *Phy-M*-РНКазами, а також РНКазою із *V. cerevis*, специфічними щодо гуанозину, аденозину, аденозину+уридину, піримідинів.

Реконструкцію первинної структури тРНК<sup>Tyr1</sup> з печінки бика здійснювали на підставі даних гель-секвенування, при цьому спираліся також на значення узагальненої первинної структури тРНК [11]. Структура виявилася ідентичною за нуклеотидним складом (без урахування модифікованих основ, які не визначалися) тРНК<sup>Tyr</sup> з антикодоном Q\*ΨA із печінки бика, первинна структура якої була розшифрована раніше [12]. Тирозинова тРНК<sub>Q\*ΨA</sub> печінки бика має 76 нуклеотидів і містить 17 модифікованих нуклеозидів, серед яких два гіпермодифікованих нуклеозиди — 3(3-аміно-3-карбоксіпропіл)-уридин (аср3U) і β-D-галактозил-к'юозин (Q\*), а також середню позицію антикодона займає псевдоуридин [12].

Далі цей препарат індивідуальної тРНК<sup>Tyr1</sup> використовували для вивчення її просторової структури, а також взаємодії з гомологічною аміноацил-тРНК-синтетазою.

Паралельно з уже наведеними структурними дослідженнями тРНК<sup>Tyr1</sup> проводилося секвенування тРНК<sup>Tyr2</sup> за допомогою вищезгаданих прийомів. В результаті цього було одержано попередню первинну структуру тРНК<sup>Tyr2</sup>, яка відрізнялася від такої тирозинової тРНК<sub>Q\*ΨA</sub> в 27-, 34- та 46-му положеннях. У тирозинової тРНК<sub>Q\*ΨA</sub> в цих положеннях присутні відповідно *m*<sub>2</sub><sup>2</sup>G, Q\* і *m*<sup>1</sup>G [12], в той час як у тРНК<sup>Tyr2</sup> — A, X (модифікований нуклеозид) та A відповідно. Дуже важливим є визначення повної первинної структури тРНК<sup>Tyr2</sup>, яке буде метою подальшої роботи, оскільки в літературі [3] приводяться відомості про дві ізоакцепторні тирозинові тРНК, які відрізняються в 34-му положенні (присутність G або модифікованого його похідного Q).

Таким чином, використана схема очистки тирозинових тРНК є ефективною для препаративного виділення тРНК<sup>Tyr1</sup> і тРНК<sup>Tyr2</sup>. Виходячи з даних гель-секвенування і знання узагальненої первинної структури тРНК [11], первинна структура тРНК<sup>Tyr1</sup> печінки бика є ідентичною (крім модифікованих основ, які не визначалися) тРНК<sup>Tyr</sup> з антикодоном Q\*ΨA [12].

L. G. Kalachnyuk

#### INDIVIDUAL ISOACCEPTOR TYROSINE tRNAs FROM BOVINE LIVER. ISOLATION AND CHARACTERISTIC

#### Summary

Combination of two chromatographies of BD-cellulose in the presence and in the absence of Mg<sup>2+</sup> was applied for high yield isolation of individual isoacceptor tyrosine tRNAs from bovine liver. The final purification of tyrosine tRNAs was achieved by gel electro-

phoresis on a 7 % denaturing gel at 7 M urea. The nucleotide sequence of tRNA<sup>Tyr1</sup> from bovine liver was determined to be identical to primary structure of tyrosine tRNA<sub>QΨA</sub> from bovine liver [13] (minor bases was not determined).

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Методы выделения суммарных тРНК и индивидуальных тРНК<sup>Leu</sup> и тРНК<sup>Phe</sup> из животных тканей // Методы молекуляр. биологии.— Киев: Наук. думка, 1979.— С. 98—111.
2. Brungraber E. A. Simplified procedure for preparation of «soluble» RNA from rat liver // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1962.—8, N 1.— P. 1—3.
3. Keller E., Zamechnick P. The effect of guanosine diphosphate and triphosphate on incorporation of labelled amino acids into proteins // J. Biol. Chem.—1956.—221, N 1.— P. 45—49.
4. Калачнюк Л. Г., Козак Л. А., Тукало М. А., Мацука Г. Х. Выделение и характеристика препарата индивидуальной изоакцепторной тРНК<sup>Ser1</sup> из печени быка // Биополимеры и клетка.—1987.—3, № 5.— С. 274—276.
5. Калачнюк Л. Г., Тукало М. А., Мацука Г. Х. Определение остатков фосфорной кислоты, участвующих в образовании пространственной структуры тРНК<sup>Ser</sup> печени быка // Там же.—1992.—8, № 5.— С. 12—15.
6. Peattee D. A. Direct chemical method for sequencing RNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1979.—76, N 4.— P. 1760—1764.
7. Donis-Keller H., Maxam A. M., Gilbert W. Mapping adenines, guanines in RNA // Nucl. Acids Res.—1977.—4, N 8.— P. 2527—2538.
8. Garcia C. M., Singhal R. Affinity chromatography of tyrosine transfer RNAs // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1979.—15 — P. 2791—2799.
9. Wosnick M. A., White B. N. Purification and nucleoside composition of a Q-containing aspartic acid tRNA from *Drosophila* // Ibid.—1978.—81.— P. 1131—1138.
10. Wosnick M. A., White B. N. The purification of Q-containing tRNAs by periodate modification. Purification and nucleoside composition of two related *Drosophila* tyrosine tRNAs // Biochim. et biophys. acta.—1979.—561.— P. 194—205.
11. Sprinzl M., Hartmann Th., Meisser F. et al. Complication of tRNA sequences and sequences of tRNA genes // Nucl. Acids Res.—1987.—15.— P. 53—188.
12. Johnson G. D., Pirtle I. L., Pirtle R. M. The nucleotide sequence of tyrosine tRNA<sub>QΨA</sub> from bovine liver // Arch. Biochem. and Biophys.—1985.—236, N 1.— P. 448—453.
13. Киселев Л. Л., Фаворова О. О., Лаврик О. И. Биосинтез белков от аминокислот до аминоацил-тРНК.— М.: Наука, 1984.—408 с.

Ин-т молекуляр. біології і генетики НАН України, Київ

Одержано 23.05.94