

А. В. Бакни, И. Н. Шатский

ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ ФЛЮОРОФОРОВ НА КОНЦЫ РНК ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЕЕ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ В РАСТВОРЕ

В статье описано мечение концевых остатков полирибонуклеотидов флюоресцентными метками. Реакции идут в водной среде с высокими выходами (90—100 %) и не сопровождаются модификацией внутренних нуклеотидов. В работе приведены спектроскопические характеристики флюорофоров, ковалентно связанных с РНК. Методом синглет-синглетного переноса энергии определены расстояния между концами олигонуридилатов различной длины в дуплексе поли(У)·поли(А).

Введение. Различные флюоресцентные методы используются при структурных исследованиях РНК, РНП-комплексов, изучении РНК-РНК и РНК-белковых взаимодействий, а также в других случаях. В последнее время широкое распространение получили флюоресцентные олигонуклеотидные зонды для решения разнообразных проблем. При этом всегда требуются простые и эффективные методы направленного введения меток в РНК и ДНК. В данной работе предлагается высокоэффективный способ введения флюорофора на 5'-конец рибонуклеотидов, а также показана возможность получения двух меток на концевых звеньях полимера.

Способы введения флюорофоров по 3'-концевому остатку рибозы хорошо отработаны [1, 2]. В то же время известные методы модификации РНК по 5'-концевому фосфату обладают теми или иными недостатками. Например, введение метки посредством окислительно-восстановительной конденсации [3] хотя и происходит с высокой эффективностью, но требует либо предварительного переведения РНК в форму, растворимую в органических растворителях, либо использования реагентов, обладающих солибилизирующим действием [4], что не всегда возможно, как в случае флюоресцентных красителей. Присоединение через пиррофосфатную группу [5] идет с невысоким выходом (15—20 %).

Недавно Готтих и др. [6] был предложен метод синтеза 5'-фосфамидов олигонуклеотидов с помощью водорастворимого карбодимида. Реакция протекает исключительно по фосфомоноэфирной группе олигонуклеотидов, не затрагивая межнуклеотидных фосфатных групп [6]. Ограничением метода является необходимость использования высоких концентраций амина (до 3 М), что предполагает применение только хорошо растворимых в воде аминов. Поэтому прямое присоединение труднорастворимых в воде аминокомпонент, какими обычно являются производные флюорофоров, не представляется возможным.

Взяв за основу данный метод, мы разработали двустадийный способ избирательного введения флюорофора на 5'-конец полирибонуклеотидов, а также нашли оптимальные условия модификации 3'-концевого остатка рибозы РНК, несущей метку на 5'-конце. В настоящей работе представлены результаты измерений расстояний между концами полиуридиловой кислоты различной длины в составе дуплексов поли(У)·поли(А) методом синглет-синглетного переноса энергии.

Материалы и методы. В работе использовали (pU)₁₀ производства НИКТИ БАВ (Бердск), pU, pA — «Chemarol» (ЧССР), 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)-карбодимид (ЭДК) («Merck», ФРГ), флюоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ) и эозинтисоэмикарбазид (ЭТСК) фирмы «Calbiochem» (Швейцария). Полинуклеотиды (pU)₂₉, (pU)₅₅, (pU)₁₁₀ выделяли фракционированием гидролизата поли(У) в 12 %-ном полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 7 М мочевины. Длина поли(У) более 200 нуклеотидов («Reanal», Венгрия). Гидролиз осуществляли нуклеазой S1 (НПО «Биолар», Олайне) при 37 °С в течение 30 мин.

Электрофорез карбодигидрида проводили на бумаге FN-15 (ГДР) в 2 н. АсОН при напряжении 600 В в течение 2 ч; электрофорез мононуклеотидов — на бумаге

FN-1 (ГДР) в приборе «Labog» (Венгрия) при 900—1000 В в 0,05 М ТАЕВ, рН 8,5, 1,5 ч.

Спектры поглощения снимали на приборе «Beckman» (США) в буфере А: 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 140 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА.

Микроколоночную хроматографию (МКХ) выполняли на колонке (1×50 мм) с лихросорбом-NH₂ в линейном градиенте концентрации натрий-фосфатного буфера, рН 7,5, в 7 М мочеvine с использованием жидкостного хроматографа МКСФП-4 (Ин-т орг. химии Сиб. отд-ния АН СССР, Новосибирск).

Таблица 1

Получение карбодигидридов моно-, олиго- и полинуклеотидов с помощью ЭДК в воде. Концентрация карбодигидрида 1 М, ЭДК — 0,5 М; T = 20 °C, рН 4,8

Synthesis of carbodihydrazide of mono-, oligo- and polynucleotides with EDC in water. Concentration of carbodihydrazide 1 M, EDC — 0,5 M, T = 20 °C, рН 4,8

РНК	Концентрация нуклеотида, мМ	Время реакции	Выход, %
pA	10	10 мин	60
pU		20 мин	100
(pU) ₁₀	10	20 мин	100
	1	1,5 ч	80
		3 ч	100
(PU) ₂₉	0,1	2,5 ч	80
(PU) ₁₁₆	0,05	6 ч	100

Карбодигидриды. В толсто-стенную ампулу (1×10 см) из молибденового стекла помещали 3 мл (60 ммоль) гидразингидрата и 3 мл (15,5 ммоль) дибутилового эфира угольной кислоты. Запаянную ампулу нагревали 48 ч на водяной бане в стальном кожухе. После вскрытия ампулы наблюдается быстрая кристаллизация образовавшегося карбодигидрида. Осадок перекристаллизовывали из этанола, сушили в вакуумном эксикаторе над CaCl₂ 15 ч. На электрофореграмме обнаружено одно пятно, дающее положительную реакцию с нингидрином, с электрофоретической подвижностью катиона с зарядом +2. Температура плавления 150—152 °C, что совпадает с данными [7]. Выход 75 %.

Присоединение карбодигидрида к 5'-концевой фосфатной группе РНК. К водному раствору РНК (100 мкл, 1—0,01 мМ) добавляли 16 мг (0,2 ммоль) карбодигидрида. Титровали 6 н. HCl до рН 4,6—4,8 и затем прибавляли 10 мг (50 мкмоль) ЭДК. Смесь инкубировали при 20 °C (время реакции см. в табл. 1). Мононуклеотиды анализировали методом электрофореза на бумаге; олигонуклеотиды (после очистки на биогеле Р2) — методом МКХ. Полинуклеотиды очищали на биогеле Р4. Выход модифицированного продукта оценивали для олигонуклеотидов по отношению площадей пиков исходного и конечного продуктов, а в случае полинуклеотидов — по поглощению после присоединения флюоресцеина.

Присоединение флюоресцеина к фосфокарбодигидриду РНК. К 80 мкл (1—0,01 мМ) раствора поли(U) в 0,1 М НЕРЕС·КОН, рН 7,0, добавляли 20 мкл 50 мМ раствора ФИТЦ в диметилформамиде (ДМФ). Инкубировали в темноте 2 ч при 20 °C и 1 ч при 37 °C. РНК осаждали тремя объемами этанола, осадок растворяли в 0,2 М АсОНa (рН 5,6) и экстрагировали непрореагировавший краситель фенолом. РНК три раза переосаждали этанолом. Выход 100 % (по поглощению).

Гидролиз фосфогидразидной связи и определение молярной экстинкции флюоресцеина, ковалентно связанного с 5'-концом поли(U). Инкубировали 60 мкл (0,25 мг/мл) раствора F-поли(U) в 0,1 н. HCl 1 ч при 37 °C. Титровали до рН 7,5, разбавляли до 1 мл буфером А. Сравнивали спектры поглощения F-поли(U) до и после гидролиза со спектром поглощения конъюгата ФИТЦ и карбодигидридом. Анализ спектров показал, что молярный коэффициент экстинкции при 493 нм (максимум поглощения флюоресцеина) не меняется после гидролиза HCl и составляет E₄₉₃ = (52±3)·10³ М⁻¹ см⁻¹, E₂₆₀ = (45±3)·10³ М⁻¹ см⁻¹.

Присоединение к 3'-концу F-поли(U) ЭТСК. К 50 мкл (1 мг/мл) раствора F-поли(U) в буфере (25 мМ НЕРЕС·КОН, рН 7,1, 1 мМ MgCl₂) добавляли 5 мкл раствора NaIO₄ (25 мг/мл). Инкубировали 20 мин при 0 °C. РНК осаждали этанолом. Растворяли в 50 мкл 0,1 М АсОНa, рН 5,6 и инкубировали с 3 мкл этиленгликоля 20 мин при 0 °C. Переосаждали этанолом. Растворяли в 0,1 М АсОНa, рН 5,6, добавляли 7 мкл раствора ЭТСК (32 мг/мл) в диметилсульфоксиде и инкубировали 3 ч при 20 °C. РНК очищали от красителя, как и в случае мечения флюоресцеином. Выход 80—90 % (по поглощению).

Модификация 16S РНК и 5S РНК. К раствору рРНК (100 мкл, 1—2 мг/мл), содержащему 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, добавляли 16 мг (0,2 ммоль) карбодигидра-

зида. Титровали 6 н. HCl до pH 4,6—4,8 и затем к полученной смеси добавляли 10 мг (50 мкмоль) ЭДК. Инкубировали при 10°C в течение 8 ч. рНК 3—4 раза пересаждали этанолам, осадок растворяли в 100 мкл буфера, содержащего 70 мМ HEPES × KOH, pH 7,0, 0,5 мМ MgCl₂, 30 мМ NaCl. К раствору добавляли 25 мкл 0,05 М раствора ФИТЦ в ДМФ, инкубировали в темноте 3 ч при 20°C. РНК очищали от красителя, как описано выше. Степень модификации 90—100% (по поглощению).

Флуоресцентные измерения проводили на поляризационном спектрофлюориметре «AMINCO SPF-1000 CS» при 10°C в буфере А. Концентрация поли(U) 2·10⁻⁷ М, поли(А) — 1·10⁻⁶ М.

Определение критического расстояния *R*. Величину критического расстояния рассчитывали по формуле: $R_0 = (8,79 \cdot 10^{-5} \cdot k^2 \cdot n^{-4} \cdot I_{da} \cdot q_d)^{1/6}$, где *n* — оптическая плотность среды равна 1,4 [1]; *q_d* — квантовый выход донора (*q_d* = 0,55); *k*² — ориентационный множитель, характеризующий взаимную ориентацию диполей переходов донора и акцептора, принимали равным 2/3 [8]. Интеграл перекрывания ($I_{da} = \int_0^{\infty} F_d(\lambda) \cdot E_a(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda / \int_0^{\infty} F_d(\lambda) \cdot d\lambda$) спектра флуоресценции донора *F_d*(λ) и спектра поглощения акцептора *E_a*(λ) определяли численным интегрированием по методу Симпсона на мини-ЭВМ «Искра-226» ($I_{da} = 2,47 \cdot 10^{-13} \text{ М}^{-1} \text{ см}^3$).

Результаты и обсуждение. На первой стадии мы синтезировали 5'-фосфокарбодигидразид РНК конденсацией карбодигидазида и полирибонуклеотидов в присутствии ЭДК (рис. 1). Вместо амина был использован карбодигидразид, так как он хорошо растворим в воде и имеет рК около 5,5, что позволяет проводить реакции с NH₂-реагентами, например ФИТЦ, при рН около 7,0.

Условия реакции конденсации обрабатывали последовательно сначала на мононуклеотидах, а затем на олиго- и полинуклеотидах. В случае мононуклеотидов реакционную смесь анализировали методом электрофореза на бумаге, как описано в [6]. Фосфокарбодигидразиды олиго- и полинуклеотидов очищали на биогелях Р2 и Р4 соответственно. Степень модификации олигонуклеотидов определяли методом МКХ. Присоединение карбодигидазида к мононуклеотидам проходило на 100% за 20 мин, к олигонуклеоти-

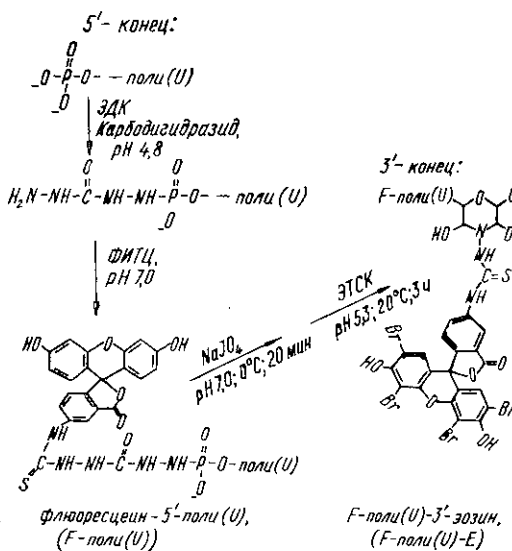


Рис. 1. Схема модификации 5'- и 3'-концевых звеньев полиуридиловой кислоты

Fig. 1. A scheme of modification of 5'- and 3'-terminal chains of polyuridylic acid

дам — за 3—4 ч и к полинуклеотидам — за 6—8 ч (табл. 1). Следует отметить, что в процессе реакции модификации гетероциклических оснований не происходит [6].

На следующем этапе фосгогидразид РНК вводили в реакцию с ФИТЦ. Взаимодействие протекало количественно за 3 ч (2 ч, 20°C и 1 ч, 37°C при рН 7,0). Конечная концентрация ФИТЦ должна быть 4—5 мг/мл, так как более высокая концентрация реагента может приводить к понижению рН из-за его гидролиза [9]. В специальных контрольных опытах было установлено, что в условиях реакции ФИТЦ не модифицирует гетероциклических оснований.

Для введения акцептора на 3'-конец РНК мы использовали широко применяющийся метод присоединения гидразидов к 3'-концевому остатку рибозы после окисления его периодатом натрия. Нами было

обнаружено, что при обработке F-поли(U) периодатом натрия происходит отщепление метки от РНК, при этом флюорофор не разрушается. Отщепление метки связано, по-видимому, с окислением замещенного карбонгидрида, так как известен факт окисления периодатом натрия незамещенных гидразидов кислот в условиях реакции окисления циклодипольной группы рибозы [10]. Изучив зависимости скоростей окисления остатка рибозы и отщепления 5'-концевой метки от температуры

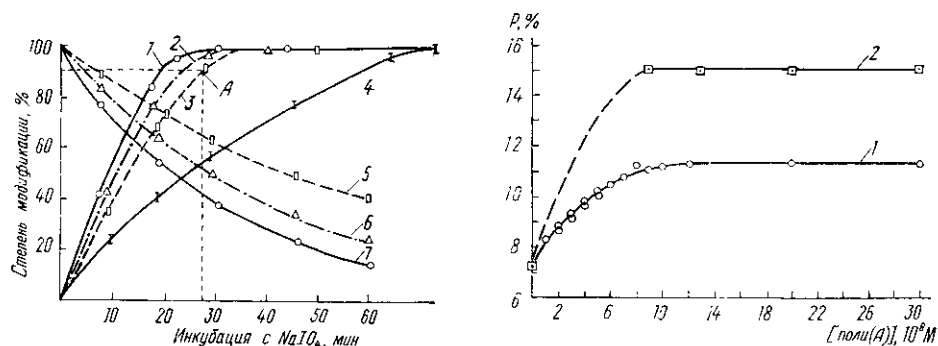


Рис. 2. Степень присоединения эозина к F-поли(U) в зависимости от условий окисления 3'-концевого остатка рибозы и уровень отщепления флюоресцеина от F-поли(U): 1, 3, 5, 7 — концентрация NaIO_4 20 мг/мл, температура 20, 0, 0, 20 °C соответственно; 2, 4, 6 — концентрация NaIO_4 20, 5, 40 мг/мл соответственно при 0 °C

Fig. 2. Extent of cosin binding to F-poly(U) under different conditions of oxidation of the 3'-terminal ribose residue (a) and the level of fluorescein splitting-out from F-poly(U) (b): 1, 3, 5, 7 — concentration of NaIO_4 — 20 mg/ml, $t=20, 0, 0, 20$ °C, respectively; 2, 4, 6 — concentration of NaIO_4 — 20, 5, 40 mg/ml, respectively, at 0 °C

Рис. 3. Изотермы адсорбции олиго(U) на поли(A). Концентрация олиго(U) $2 \cdot 10^{-7}$ M
Fig. 3. Adsorption isotherms of oligo(U) · poly(A). Concentration of oligo(U) $2 \cdot 10^{-7}$ M

и концентрации периодата натрия (рис. 2), мы нашли условия, при которых остаток рибозы окисляется количественно, в то время как отщепление метки составляет только 30—35 % (рис. 2, точка A на кривой 3). Конечная степень модификации 5'-концевого флюорофора (60—65 %) удовлетворяет требованиям, предъявляемым к донору для проведения экспериментов по миграции энергии.

F-поли(U) с окисленным 3'-концевым остатком рибозы обрабатывали ЭТСК при pH 5,3. В результате реакции к диальдегидной группе присоединяется одна молекула ЭТСК с образованием структуры II (рис. 1) [11].

Степень модификации РНК флюоресцеином и эозином определяли из спектров поглощения, учитывая вклады меток в поглощение при 260 нм и перекрывание спектров поглощения флюорофоров.

Были исследованы спектроскопические характеристики ковалентно связанных флюорофоров. Определены коэффициенты молярной экстинкции в максимумах поглощения флюоресцеина $E_{493} = (52 \pm 3) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ и эозина $E_{518} = (55 \pm 3) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Квантовый выход флюоресценции флюоресцеина составляет $q=0,55$ относительно раствора хинин-сульфата в 0,05 н. H_2SO_4 , для которого $q=0,7$ [12]. Для данной пары флюорофоров было определено критическое расстояние R_0 , на котором вероятность миграции энергии равна вероятности эмиссии [8]. Величина R_0 равна 5,4 нм для $k^2=2/3$.

Для отработки методики измерения расстояний по методу миграции энергии и оценки надежности метода при использовании пары флюорофоров флюоресцеин — эозин мы выбрали модельную систему — дуплекс поли(U) · поли(A). Длина поли(A) была около 200 нуклеотидов, а поли(U) брали длиной 17—18 и 40—42 нуклеотида. Данная система хороша тем, что для нее из рентгеноструктурных измерений известно расстояние между нуклеотидами — 0,31 нм [13]. Отсюда можно

оценить расстояние между флюорофорами на концах поли(U), которое для (pU)₁₈ с учетом вклада меток составляет 5,6—6,0 нм, а для (pU)₄₂ — около 13,5 нм. Согласно теории Ферстера следует ожидать эффективности переноса энергии при $k^2=2/3$ около 50 и менее 5 % соответственно.

С тем чтобы подобрать условия образования дуплекса в отсутствие кооперативного связывания нескольких молекул олиго(U) с одной молекулой поли(A), были исследованы изотермы адсорбции меченного по 5'-концу олиго(U) на поли(A) (рис. 3). Как и следовало ожидать, комплексобразование сопровождается возрастанием поляризации флюоресценции метки. Оказалось, что если титровать поли(U) малыми порциями поли(A) (рис. 3, кривая 1), происходит кооперативная сборка дуплекса, что проявляется в снижении конечной поляризации флюоресценции метки вследствие миграции энергии между молекулами флюорофоров. И наоборот, если сразу добавлять значительное количество поли(A), то данного эффекта не наблюдается, а поляризация флюоресценции возрастает до максимального значения в данной системе (рис. 3, кривая 2). Поэтому при проведении экспериментов по переносу энергии, чтобы заведомо исключить кооперативную сборку, комплексобразование проводили сразу, добавляя к поли(U) 10-кратный избыток поли(A).

Для определения эффективности переноса энергии ($E_{эф}$) оценивали квантовый выход донора без (q_d) и в присутствии акцептора энергии (q_{da}). Мы снимали поляризованные спектры флюоресценции трех образцов дуплексов поли(U)·поли(A), в которых полиуридиловая кислота была мечена: а) по 5'-концу флюоресцеином (донор энергии) для учета влияния поли(A) на q_d ; б) по 3'-концу эозином (акцептор энергии) и в) донором и акцептором. Поглощение флюорофоров составляло $<0,1$ единицы оптической плотности при длине волны возбуждения.

Эффективность миграции энергии рассчитывали двумя независимыми методами — по тушению флюоресценции донора (E_d), учитывая степень модификации акцептора, и по разгоранию интенсивности акцептора (E_a), учитывая степень модификации донора и акцептора. Полученные значения E усредняли и использовали для расчета расстояния (R) между донором и акцептором по формуле: $E_{эф} = 1 / (1 + R/R_0)^6$ [8]. Неопределенность в k^2 учитывали, как в [14]. Экспериментальные значения хорошо согласуются с теоретически рассчитанными (табл. 2), что говорит о надежности метода при использовании избранной пары флюорофоров.

Нами также была проверена методика введения флюорофоров на 5'-конец РНК на рибосомных 5S и 16S РНК. Степень модификации рРНК, оцененная спектрофотометрически, составляла 90—100 %. Меченые рРНК не изменяли своей подвижности в 8 %-ном ПААГ, что свидетельствовало о сохранении целостности молекул.

Таким образом, предложенный способ введения меток на 5'-конец РНК позволяет в мягких условиях с высоким выходом и избиратель-

Таблица 2

Эффективность миграции энергии и расстояния между концами полиуридиловой кислоты в дуплексе поли(U)·поли(A)

Efficiency of energy transfer and distances between the ends of polyuridylic acids in the poly(U)·poly(A) duplex

Длина поли(U)	E_d , %	E_a , %	R , нм (теорет.)	R , нм (эксперим.)	r_d	r_a
17—18	58	53	5,2—5,8	5,0—5,8	0,21	0,12
40—45	5	0	13,5	9,0	0,22	0,11

Примечание. r_d , r_a — анизотропии поляризованной флюоресценции донора и акцептора (в отсутствие донора) соответственно.

ностью получать производные как синтетических гомополимеров, так и природных РНК.

Авторы благодарят О. Ф. Борисову за постоянное внимание при проведении экспериментов по миграции энергии; А. Г. Евстафьеву, А. Н. Муравьеву — за помощь в работе, М. Б. Готтих и М. Г. Ивановскую — за ценные советы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Distances between 3' ends of rRNAs reassembled into E. coli ribosomes* / O. W. Odom, D. I. Robbins, J. Lynch et al. // *Biochemistry*.—1980.—19, N 24.—P. 5947—5954.
2. *Distance measurement by energy transfer: the 3' ends of 16S RNA and proteins S4 and S17 of ribosomes of E. coli* / В. Ере, Р. Wooley, К. G. Steinhauser, J. Littlechild // *Eur. J. Biochem.*—1982.—129, N 1.—P. 211—219.
3. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н. Селективная модификация монозамещенных фосфатных групп в 5'-моно- и полифосфатных нуклеозидах и олигонуклеотидах // *Биоорг. химия*.—1979.—5, № 6.—С. 886—894.
4. Мочалова Л. В., Шатский И. Н., Богданов А. А. Избирательная модификация 5'-концевых фосфатных групп транспортных и рРНК // Там же.—1982.—8, № 2.—С. 239—242.
5. Jang C. H., Soll D. Covalent attachment of fluorescent groups to the 5' ends of tRNA // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1973.—155, N 1.—P. 70—81.
6. Готтих М. Б., Ивановская М. Г., Шабарова Э. А. Получение фосфамидов моно- и олигонуклеотидов в водной среде // *Биоорг. химия*.—1983.—9, № 8.—С. 1063—1067.
7. Stolle R., Hofmann K. Ueber hydrazincarbonsaure // *Berichte*.—1904.—37.—S. 4523—4524.
8. Forster Th. Intermolecular energy transfer migration and fluorescence // *Ann. Phys.*—1948.—2.—P. 55—75.
9. Reines S. A., Shulman L. H. A new method for attachment of fluorescent probes to tRNA // *Meth. Enzymol.*—1979.—49.—P. 146—156.
10. *Органическая химия нуклеиновых кислот* / Н. К. Кочетков, Э. И. Будовский, Е. Д. Свердлов и др. / Под ред. Н. К. Кочеткова.—М.: Химия, 1970.—718 с.
11. Hansske F., Sprinzl M., Cramer F. Reaction of the ribose moiety of adenosine and AMP with periodate and carboxylic acid hydrazides // *Bioorg. Chem.*—1974.—3, N 2.—P. 367—372.
12. *Emission properties of NADH. Studies of fluorescent lifetimes and quantum efficiencies of NADH, AcPyADH, and simplified synthetic models* / T. G. Scott, R. D. Spenser, N. J. Leonard, G. Weber // *J. Amer. Chem. Soc.*—1970.—92, N 3.—P. 687—695.
13. Sasisekharan A. B., Sigler G. J. An X-ray diffraction study of poly(A-U) // *J. Mol. Biol.*—1965.—12, N 2.—P. 296—298.
14. Haas E., Katchalski-Katzir E., Steinberg I. Z. Effect of the orientation of donor and acceptor on the probability of energy transfer involving electronic transitions of mixed polarization // *Biochemistry*.—1978.—17, N 23.—P. 5064—5070.

Межфакультет. пробл. н.-н. лаб. молекуляр. биологии
и биоорг. химии им. А. Н. Белозерского,
МГУ им. М. В. Ломоносова

Получено 11.12.88

SELECTIVE FLUORESCENT LABELLING OF THE RNA ENDS TO STUDY ITS MACROMOLECULE STRUCTURE IN THE SOLUTION

A. V. Bakin, I. N. Shatsky

A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry;
M. V. Lomonosov State University, Moscow

Summary

The method for selective fluorescent labelling of the polynucleotides ends is described. Reactions are performed in water with high yields (90-100%) followed by no modification of the RNA bases. The distances between the ends of oligouridylates of different length in duplex of poly(U)·poly(A) is determined by the singlet-singlet energy transfer method.