TRANSCRIPTION AND TRANSLATION
A PRACTICAL APPROACH

Edited by
B. D. HAMES
Department of Biochemistry,
University of Leeds, Leeds, England
S. J. HIGGINS
Department of Biochemistry
University of Leeds, Leeds, England

IRL PRESS
Oxford·Washington DC

Транскрипция и трансляция

МЕТОДЫ

Под редакцией
Б. ХЕЙМСА, С. ХИГГИНСА

Перевод с английского
канд. биол. наук
А. М. КОЛЧИНСКОГО
и
канд. биол. наук
Н. В. СОНИНОЙ
под редакцией
чл.-корр. АН СССР
Е. Д. СВЕРДЛОВА

Москва
«Мир»
1987

ББК 28.04
Т65
УДК 575+577.1

Гердон Дж., Спандидос Д., Уилки Н., Колмен А., Мэнли Дж., Марзлаф У., Хуан Р., Гилмор С., Стоукер Н., Пратт Дж., Холланд Б., Клеменс М., Минтер С., Сили П.

Транскрипция и трансляция. Методы: Пер. с англ./Под
Т65 ред. Б. Хеймса и С. Хиггинса. — М.: Мир, 1987. 400 с., ил.

Книга английских авторов вышла в хорошо зарекомендовавшей себя серии «Практические подходы» издательства IRL Press. В ней изложены новые методы изучения экспрессии генов (главным образом эукариот) на уровне транскрипции и трансляции, причем подробное теоретическое обоснование сочетается с тщательным описанием техники работы. По содержанию книга не перекрывается с ранее изданными руководствами по методам генной инженерии.

Для специалистов в области молекулярной биологии и биотехнологии.

Т $\frac{2001040000-456}{041(01)-87}$ 137—87 ч. 1 ББК 28.04

Редакция литературы по биологии

© 1984 IRL Press Limited
© перевод на русский язык,
«Мир», 1987

ПРЕДИСЛОВИЕ РЕДАКТОРА ПЕРЕВОДА

Если сегодня мы имеем представление о том, что такое промоторы и терминаторы, энхансеры и сайленсеры, как осуществляется процессинг РНК, какие структурные элементы РНК важны для инициации трансляции и какие белковые факторы участвуют в этом процессе, то это является следствием разработки простых и эффективных методов исследования экспрессии генов на разных уровнях. Благодаря им получена информация об участии генов в процессах развития и дифференцировки, в опухолевой трансформации, в процессах вирусных инфекций и иммунном ответе организма как на эти инфекции, так и на вторжение любых чуждых для организма антигенов. И этот перечень достижений можно было бы при желании продолжить. Как это обычно бывает при любом исследовании, всегда возникает ситуация, когда с помощью уже известных методов удается решить наиболее очевидную часть проблемы и на первый план выдвигаются новые ее аспекты, которые раньше, на прежнем уровне наших знаний, оставались в тени. Эти новые аспекты, перерастающие в новые проблемы, или вновь возникающие проблемы требуют совершенствования старых и разработки новых методов. С этой точки зрения важно представлять возможности имеющейся сегодня методической базы в решении задач сегодняшнего дня и в приспособлении ее к перспективным исследованиям.

Если говорить о сегодняшнем дне, то совершенно очевидно, что существует сформировавшаяся группа методов, рутинно используемых во всем мире для решения самых разнообразных задач, которые объединены тем, что каждая из них так или иначе связана с экспрессией генов и ее регуляцией. Сейчас уже можно, по-видимому, с достаточной уверенностью утверждать, что эта группа методов будет еще очень долго служить основой развития молекулярной биологии и молекулярной генетики (это не исключает, конечно, и появления новых подходов). Поэтому очень важно, чтобы исследователь, приступающий к изучению какой-либо проблемы в этой области, применял хорошо разработанные стандартные приемы. Стандартизация методов в науке не менее важна, чем в промышленности. Она

позволяет сопоставлять и сводить воедино результаты, получаемые в разных лабораториях. По-видимому, не будет большим преувеличением сказать, что решение любой задачи обязательно следует начинать с применения имеющихся стандартных подходов, и только если они не работают, нужно их изменять, но изменять на основе полученного опытным путем представления, почему не работают стандартные методы.

Появившиеся недавно методические пособия [такие, например, как ставшая уже настольной лабораторной книгой «Молекулярное клонирование» Т. Маниатиса и др. (Москва, Мир, 1984)] представляют собой попытки ввести стандартизацию в методы научного поиска. Такого рода пособием является и предлагаемая советскому читателю книга «Транскрипция и трансляция. Методы». В ней описаны устоявшиеся методы, рутинно применяющиеся для исследования различных этапов транскрипции и трансляции. Среди них — методы введения чужеродной генетической информации в клетки млекопитающих и селекции образующихся трансформантов, методы исследования транскрипции и процессинга РНК в ооцитах *Xenopus laevis*, в клеточных экстрактах, в изолированных клеточных ядрах, методы сопряженной транскрипции — трансляции в прокариотических системах и методы трансляции эукариотической мРНК в бесклеточных экстрактах и в ооцитах *Xenopus*.

Авторы книги являются известными специалистами в данной области, и публикуемые методики отражают их личный опыт, что придает изложению особую ценность. Важно, что каждая из глав носит критический и творческий характер, т. е. в ней рассматриваются не только достоинства разработанного автором метода, но и его недостатки, область применения и перспективы развития. Чисто методические разделы логично сочетаются с теоретическим обоснованием методов, а их применение проиллюстрировано на примере решения конкретных задач. С этой точки зрения книга является не только методическим пособием, но и обзором достижений в области исследования экспрессии генов.

Несомненно, это издание будет полезно и опытным исследователям, и ученым, начинающим работать в этой области, и студентам, которые могут при первом чтении опустить методические прописи, даваемые в таблицах, и ознакомиться с проблемами исследований экспрессии генов и основами применяющихся здесь методов.

Е. Д. Свердлов

ПРЕДИСЛОВИЕ

Исследование транскрипции генов и судьбы соответствующих мРНК было и остается основой изучения как механизма экспрессии генов, так и ее регуляции. Кроме того, в последнее время методы молекулярной биологии и молекулярной генетики начинают применяться все большим числом исследователей-биологов. Цель настоящей книги состоит в том, чтобы дать подробное описание лабораторных методик, применяющихся в этой важной области исследований. Мы рассматриваем вирусные, прокариотические и эукариотические гены, причем среди последних описываем в основном те, которые транскрибируются РНК-полимеразой II. Чтобы избежать ненужных повторений и в то же время включить все важнейшие методики, пришлось значительно переработать некоторые из представленных авторами глав, и мы благодарим их за то, что они с готовностью пошли на это. Однако в тех случаях, когда существуют несколько заслуживающих внимания вариантов одного и того же метода, мы приводим их полностью.

Б. Хеймс
С. Хиггинс

ВВЕДЕНИЕ

Дж. Гердон

Все, кто занимается молекулярной и клеточной биологией, хорошо понимают, насколько важны экспериментальные системы для анализа генной экспрессии, но, возможно, имеет смысл выделить два основных направления работ в этой области: определение *механизма* экспрессии генов и анализ ее *регуляции*. В первом случае идентифицируют молекулы, необходимые для экспрессии какого-либо гена. Для этого определяют, какая из нескольких клонированных ДНК кодирует продукт данного гена и какая из множества фракций РНК содержит нужную мРНК. Ответы на такие вопросы легко получить, используя соответствующие бесклеточные системы. Располагая бесклеточными системами, содержащими очищенные компоненты, можно также идентифицировать факторы, необходимые для правильной транскрипции ДНК и трансляции мРНК. Во втором случае решают гораздо более трудную задачу: пытаются установить механизм регуляции генной экспрессии. Для этого нужно знать, с какой скоростью осуществляется каждый этап генной экспрессии, и идентифицировать те компоненты, которые являются лимитирующими для каждой из стадий. Глубокий анализ генной регуляции потому и труден, что любой компонент реакции может стать лимитирующим при определенных экспериментальных условиях, хотя многие из этих условий, возможно, никогда не встречаются в норме in vivo. Выяснить, является ли данный компонент, лимитирующий реакцию in vitro, лимитирующим ее также in vivo, весьма непросто. При анализе *механизма* генной экспрессии этой проблемы не возникает, поскольку даже при иных, чем в норме, концентрациях компонентов в бесклеточной системе ее кодирующая способность и потребность в главных факторах не должны изменяться.

В идеале следует стремиться получить такую бесклеточную систему, которая целиком состояла бы из известных компонентов, а генная экспрессия в ней была бы адекватна экспрессии генов in vivo. Таких систем очень мало. Почти все наиболее употребительные бесклеточные системы содержат неочищенные экстракты, к которым добавляются очищенные компоненты, такие, как клонированная ДНК или мРНК. Подавляющее большинство систем, описанных в этой книге, относится именно к

этому классу. Система другого типа представляет собой целые клетки, в которые инъецируются определенные очищенные компоненты. Эта система оказалась более перспективной, чем предполагалось вначале. Когда клетки разрушаются, получающийся лизат обычно содержит в большом количестве ДНКазы, РНКазы и протеолитические ферменты, и на первых же этапах приготовления бесклеточных систем от всех этих компонентов необходимо избавиться или уменьшить их активность. Когда же в целую клетку инъецируют раствор ДНК или мРНК, составляющий примерно 10% объема клетки, молекулы деградируют весьма незначительно. Именно поэтому микроинъекция ДНК или мРНК в живые клетки является важным и полезным методом анализа экспрессии генов. В этом сборнике описаны различные методы и системы для микроинъекции.

Наконец, важно понимать сравнительную ценность бесклеточных систем и систем с микроинъекцией для исследования генной экспрессии. Бесклеточные системы, в особенности такие, компоненты которых в основном известны, оказались особенно ценными для выявления и дальнейшей очистки факторов транскрипции и трансляции. Целые же клетки можно использовать для подобного анализа только в исключительных случаях, например, когда в нашем распоряжении имеются клетки, не обладающие определенным фактором, и клетки другого типа, из которых этот фактор можно выделить. Недостаток бесклеточных систем заключается в том, что число этапов генной экспрессии, которые можно в них исследовать, ограничено. Кроме того, эффективность каждого этапа в этих системах может быть в 10^2—10^5 раз ниже, чем при инъецировании в клетки. Получение большей эффективности важно потому, что результаты исследования контроля того или иного этапа генной экспрессии становятся более достоверными, если условия на этом этапе близки к нормальным, а не таковы, что эффективность составляет 1% от уровня in vivo. В заключение следует отметить, что эффективность генной экспрессии необходимо знать для тех экспериментальных систем, которые используются для анализа регуляции генной экспрессии; при анализе механизма генной экспрессии этот вопрос не столь существен.

За последние годы экспериментальные системы были значительно усовершенствованы: увеличилось как разнообразие, так и эффективность исследуемых этапов экспрессии генов. Более того, системы и их источники стали гораздо более разнообразны. Поэтому я полагаю, что настоящий сборник будет полезен широкому кругу исследователей. Его главы написаны учеными, обладающими большим опытом работы с применением описанных методов, а в большинстве случаев непосредственно участвовавшими в их разработке.

ЭКСПРЕССИЯ ЭКЗОГЕННОЙ ДНК В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Д. Спандидос, Н. Уилки

1. Введение

Введение изолированной ДНК в клетки млекопитающих, растущие в культуре (перенос генов с помощью ДНК), стало одним из наиболее мощных инструментов для анализа экспрессии эукариотических генов. В настоящее время этот подход используется для идентификации и анализа сигналов регуляции транскрипции в геномах эукариот, для исследования сплайсинга РНК, для анализа механизмов генной модуляции в процессе дифференцировки и под действием таких регуляторов, как гормоны для идентификации и исследования клеточных онкогенов, связанных с канцерогенезом. В этой главе описаны методы, применяемые в настоящее время для переноса генов с помощью ДНК в клетки млекопитающих, растущие в культуре, и проиллюстрировано применение этого подхода для анализа экспрессии генов.

Существует несколько методов введения изолированной ДНК в клетки млекопитающих, растущие в культуре; эти методы описаны в разд. 2. Наиболее широко применяется кальций-фосфатная методика трансфекции, хотя в некоторых случаях предпочтительными могут оказаться другие способы (разд. 2.7). Применяя кальций-фосфатный метод, можно использовать донорную ДНК практически любого происхождения (в том числе фаговые частицы или целые хромосомы), а экспрессию генов в реципиентных клетках можно определять или после короткого периода установления равновесия (временная экспрессия), или после превращения клеточной культуры в стабильно трансформированную. Если донорная ДНК кодирует какой-либо маркер, по которому может производиться отбор, то стабильно трансформированные клетки легко получить, используя для культивирования подходящие селективные среды. Соответствующие подходы описаны в разд. 2.1, где рассматривается применение кальций-фосфатной методики для широко используемого селектируемого маркера — гена тимидинкиназы (*tk*) вируса простого герпеса типа 1 (HSV-1) и ТК$^-$-мутантных клеток в качестве реципиентов. Применение других селектируемых маркеров описано в общих чертах в разд. 3. Если донорная ДНК не содержит подходящего маркерного гена, то ее смеши-

вают с другой ДНК, несущей такой маркер, и проводят совместную трансформацию. После отбора по этому маркеру трансформированные клетки можно проверить на коэкспрессию генов, содержащихся в первой ДНК (разд. 2.1.8).

Упомянутые методики, в которых для трансфекции используется изолированная ДНК, можно рассматривать как *векторные системы на основе ДНК*. Поскольку эти системы применяются в настоящее время наиболее широко, им посвящена значительная часть данной главы. Альтернативный метод основан на использовании вирусов эукариот в качестве векторов для нужной ДНК и он находит все более широкое применение. Такие *векторы на основе вируса* кратко описаны в разд. 4. Наконец, в разд. 5 этой главы рассмотрена экспрессия перенесенных генов в реципиентных клетках и изложены подходы, которые используются в сочетании с системами генного переноса для анализа регуляции экспрессии генов в эукариотических клетках.

Более специфические методы — микроинъекция экзогенной ДНК в ооциты *Xenopus* и применение таких систем для изучения генной экспрессии — описаны в гл. 2.

2. Методы введения ДНК в клетки млекопитающих

Без использования специальных методик введение экзогенной ДНК в клетки млекопитающих и ее экспрессия происходят с малой эффективностью. Попытки увеличить биологическую активность выделенных генов привели к разработке разнообразных методов повышения эффективности включения ДНК и ее последующей экспрессии. Они описаны в следующих разделах.

2.1. Кальций-фосфатная методика трансфекции

Кальций-фосфатный метод введения генов в клетки млекопитающих был впервые описан в работе [1] и в настоящее время используется наиболее широко. Он применяется для введения любой ДНК в клетки млекопитающих как при исследовании временной экспрессии, так и для стабильной трансформации (разд. 5). В общих чертах метод состоит в следующем. Экзогенную ДНК смешивают с хлористым кальцием и затем добавляют к раствору, содержащему фосфатные ионы. В результате происходит соосаждение ДНК с фосфатом кальция, образующийся осадок легко проникает в культивируемые клетки млекопитающих, и затем происходит эффективная экспрессия экзогенного гена.

Со времени появления этой методики возникло несколько ее модификаций. По опыту авторов для решения большинства

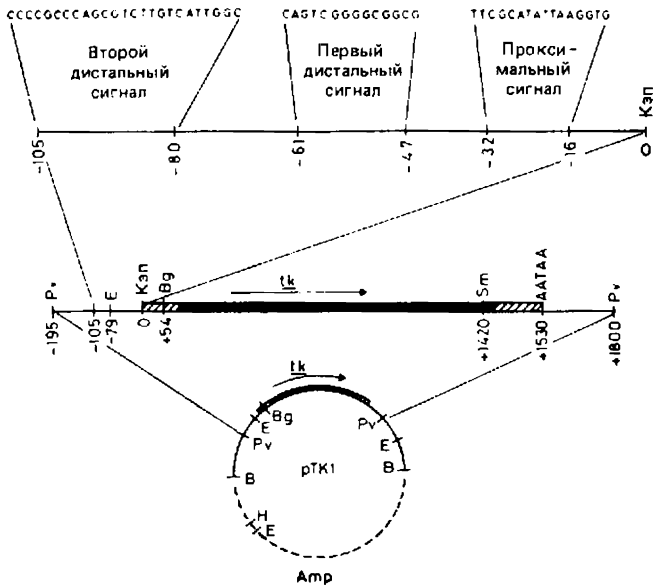


Рис. 1. Рестрикционная карта рекомбинантной плазмиды pTK1, на которой показаны нуклеотидные последовательности, участвующие в регуляции экспрессии гена *tk*. Эта плазмида содержит ген *tk* HSV-1, клонированный в плазмиде pAT153 [2]. Пунктирная линия отвечает плазмиде pAT153, сплошные линии — последовательностям ДНК HSV-1; жирной полоской обозначена кодирующая часть последовательности гена, заштрихованной — некодирующая. Три регуляторные последовательности, расположенные слева от кэп-участка, обозначены как проксимальный, первый дистальный и второй дистальный сигналы [3]. Все нуклеотиды пронумерованы в соответствии с их расположением относительно кэп-участка. Карты изображены без соблюдения масштаба. E — *Eco*RI, H — *Hind*III, Pv — *Pvu*II, Sm — *Sma*I, Bg — *Bgl*II, B — *Bam*HI. Amp — бактериальный ген β-лактамазы, сообщающий устойчивость к антибиотику ампициллину. AATAA — каноническая последовательность для сигнала полиаденилирования в эукариотических клетках.

задач наилучшим является способ, описанный в табл. 1. Рассмотрена трансформация L-клеток мыши, дефицитных по тимидинкиназе (LATK$^-$-клеток), путем введения в них ДНК, содержащей *tk*-ген плазмиды pTK1 (рис. 1). Уточним некоторые моменты этой методики.

1. Донорную ДНК в концентрации 40 мкг/мл в буфере 1 мМ трис-HCl, 0,1 мМ ЭДТА, 0,25 М $CaCl_2$, pH 8,0 при постоянном перемешивании медленно добавляют к равному объему 2×HBS. Обычно в течение 30 с смешивают 1 мл ДНК и 1 мл буфера. Если в качестве донорной ДНК используются небольшие количества вирусной ДНК или клонированных генов, то необходимо добавить ДНК-носитель, чтобы концентрация суммарной ДНК составила 20 мкг/мл.

Таблица 1. Кальций-фосфатная методика переноса генов[1]

Эта методика рассмотрена на примере трансформации LATK⁻-клеток мыши путем введения ДНК, содержащей *tk*-ген, например плазмиды pTK1 (рис. 1).

1. Приготовьте следующие растворы:
   2×HEPES-солевой раствор (2×HBS)
   1,63 г NaCl
   1,19 г HEPES
   0,023 г $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$
   Дистиллированная вода до 100 мл
   Доведите pH до 7,1, добавив 0,5 М NaOH
   Простерилизуйте раствор фильтрованием и храните при 4 °С.
   Конечные концентрации компонентов в 2×HBS: 0,28 М NaCl, 1,5 мМ Na_2HPO_4, 50 мМ HEPES, pH 7,1.
   2,5 М $CaCl_2$
   Растворите 10,8 г $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ (Analar) в 20 мл (конечный объем) дистиллированной воды, простерилизуйте фильтрованием и храните при 4 °С.
   0,1 мМ ЭДТА, 1,0 мМ трис-HCl, pH 8,0
   Смешайте 50 мкл 0,2 М ЭДТА, pH 8,0, и 100 мкл 1,0 М трис-HCl, pH 8,0, с дистиллированной водой до конечного объема 100 мл. Простерилизуйте раствор фильтрованием и храните при 4 °С.
2. Соберите экспоненциально растущие LATK⁻-клетки, используя трипсинизацию.
3. Вновь рассейте клетки при плотности $1 \cdot 10^6$ клеток на флакон (площадь роста 25 см²), в который налито 5 мл свежей подогретой среды[2] [среда SF12 (Flow Laboratories), содержащая 15% сыворотки Hyclone (Sterile Systems Inc.)]. Проинкубируйте 24 ч при 37 °С.
4. Внесите 0,5 мл донорной ДНК (например pTK1, см. рис. 1) вместе с ДНК-носителем (если потребуется) в маленький пластиковый флакон. Концентрация суммарной ДНК 80 мкг/мл, буфер — 0,1 мМ ЭДТА, 1,0 мМ трис-HCl, pH 8,0. Добавьте 0,4 мл 0,1 мМ ЭДТА, 1,0 мМ трис-HCl, pH 8,0, и 0,1 мл 2,5 М $CaCl_2$. Перемешайте.
5. Медленно (~30 с), при непрерывном перемешивании, добавьте этот раствор ДНК к 1 мл 2×HBS во второй маленький флакон. Сразу перемешайте смесь встряхиванием и оставьте ее при комнатной температуре на 30 мин. Конечная концентрация ДНК должна быть равна 20 мкг/мл.
6. После инкубации образуется тонкий осадок. Добавьте по 0,5 мл этой ДНК-кальций-фосфатной суспензии к каждому флакону, содержащему клетки в 5 мл ростовой среды.
7. Проинкубируйте чашки при 37 °С в течение 24 ч для того, чтобы клетки абсорбировали ДНК-кальций-фосфатный преципитат.
8. Стадия экспрессии, предшествующая селекции. Замените среду свежей подогретой средой и проинкубируйте при 37 °С еще 24 ч для того, чтобы произошла экспрессия перенесенного гена (генов).
9. Стадия селекции. Замените среду на соответствующую селективную среду, в данном случае на среду HAT (среда SF12, содержащая 15%-ную сыворотку, 0,1 мМ гипоксантин, 0,4 мкМ аминоптерин, 16 мкМ тимидин)[2, 3].
10. Обновляйте селективную среду каждые 2—3 сут в течение 2—3 нед, после чего подсчитайте колонии обычным способом[4].
11. Чтобы отобрать индивидуальные колонии, слейте ростовую среду и срежьте верх флакона нагретым скальпелем. Поместите специальный цилиндр для клонирования из нержавеющей стали (диаметром 0,4—0,8 см) сверху каждой колонии и снимите клетки, инкубируя их 2—3 мин при комнатной

температуре в 0,1 мл 0,25%-го трипсина в стерильном забуференном растворе (6 г NaCl, 2,96 г трехзамещенного цитрата натрия, 1,79 г трицина, 0,005 г фенолового красного на 700 мл дистиллированной воды). Перенесите снятые клетки стерильной пастеровской пипеткой во флаконы со свежей подогретой ростовой средой (площадь роста 25 см^2).

---

[1] Этот метод можно использовать для введения любой ДНК в клетки млекопитающих как при исследованиях временной экспрессии, так и для стабильной трансформации (разд. 5).

[2] Используемая среда зависит от свойств реципиентных клеток.

[3] Альтернативный способ приведен в табл. 2; см. также разд. 2.1, п. 6.

[4] Если подсчет нужно вести постоянно, клетки в некоторых флаконах можно фиксировать в метаноле, охлажденном во льду, в течение 15 мин, затем окрасить 10%-ным красителем Гимза (водный раствор) в течение 15 мин и сполоснуть водопроводной водой.

---

2. Молекулярная масса ДНК-носителя влияет на конечную эффективность включения и экспрессии донорной ДНК (разд. 2.1.2).

3. После инкубации в течение 30 мин при комнатной температуре образуется тонкая взвесь ДНК—фосфат кальция, остающаяся в суспензии. Иногда в случае ДНК с очень высокой молекулярной массой образуется грубый неоднородный осадок, и тогда эффективность трансформации оказывается очень небольшой. Эту трудность можно устранить путем более медленного добавления ДНК—$CaCl_2$ к 2×HBS и непрерывного перемешивания раствора (например, путем пропускания пузырьков воздуха через смесь или встряхивания на смесителе). Можно также уменьшить молекулярную массу донорной ДНК, пропустив ее пять раз через иглу для инъекций № 19.

4. Затем суспензию ДНК — фосфат кальция добавляют к культурам клеток, не сливая предварительно культуральную среду. Обычно добавляют 1 мл суспензии ДНК — фосфат кальция к 10 мл культуры. Объем вводимой суспензии должен составлять 1/10 объема среды, чтобы конечная внеклеточная концентрация ионов кальция была на нужном уровне.

5. После введения суспензии ДНК — фосфат кальция культуры инкубируют при 37 °С в течение 24 ч. Затем среду заменяют свежей средой и продолжают инкубацию еще в течение 24 ч при 37 °С. Эту среду снова удаляют и заменяют подходящей селективной средой, которую меняют каждые 2—3 сут в течение 2—3 нед. Используемая селективная среда зависит от поставленных задач, свойств реципиентных клеток и наличия селектируемых маркеров (разд. 3). После подсчета выросших колоний клетки трипсинизируют и колонии отбирают для дальнейшего анализа.

6. Другой метод отбора, отличный от описанного в пп. 9—11 табл. 1, заключается в трипсинизации клеток после стадии 8 с последующим высевом их в соответствующих разведениях при селективных условиях в жидкую или полужидкую среду [4]

Таблица 2. Метод отбора на метоцеле[1]

1. Приготовьте среду, содержащую метоцель (метоцельная среда), следующим образом:
   а. Добавьте 3 г метоцеля МС 4000 СР (Fluka) к 200 мл дистиллированной воды и проавтоклавируйте. После растворения метоцеля получается прозрачный раствор, который можно хранить при 4 °С не менее 6 мес.
   б. Непосредственно перед использованием подогрейте среду до 37 °С и добавьте:
      22,0 мл 10-кратной среды Хэма SF2[2]
      4,0 мл 50-кратной смеси незаменимых аминокислот[2]
      4,0 мл 0,1 М пирувата натрия[2]
      2,5 мл 0,2 М глутамина[2]
      5,0 мл 7,5%-го бикарбоната натрия[2]
   в. Затем добавьте 100 мл сыворотки и соответствующие количества веществ, необходимых для отбора. Так, для метоцельной среды, содержащей НАТ (0,1 мМ гипоксантин, 0,4 мкМ аминоптерин и 16 мкМ тимидин), надо добавить:
      3,40 мл 10,0 мМ гипоксантина
      0,34 мл 0,4 мМ аминоптерина
      0,34 мл 16,0 мМ тимидина
      Конечные концентрации метоцеля и сыворотки равны соответственно 0,9 и 30%.

Обратите внимание на то, что состав метоцельной среды на стадии (б) зависит от используемой линии клеток, а компоненты, требуемые на стадии (в), — от селектируемого маркера (разд. 3).

2. Начинайте трансформацию в соответствии с пп. 1—8 табл. 1. После этапа 8 проведите трипсинизацию и посчитайте клетки.
3. Смешайте 0,2 мл клеточной суспензии и 20 мл метоцельной среды в пластиковом универсальном флаконе и рассейте на бактериологические чашки (диаметр 9 см), содержащие метоцельную среду. Плотность посева зависит от ожидаемой частоты трансформации; может быть высеяно до $2 \cdot 10^6$ клеток на чашку.
4. Проинкубируйте чашки при 37 °С в течение 7—10 сут в зависимости от времени удвоения реципиентных клеток.
5. Подсчитайте колонии, пользуясь инвертированным микроскопом. Если потребуется, отберите индивидуальные колонии пастеровской пипеткой и растите их на подходящей ростовой среде (5 мл на чашку, площадь роста 25 см^2).

[1] Метоцельный метод можно использовать для отбора по любому биохимическому маркеру в любой клеточной линии, которая способна расти в метоцеле, или для отбора доминантных трансформирующих онкогенов (разд. 3.2).
[2] Соответствующие исходные растворы поставляет фирма Flow Laboratories Inc.

(например, в среду с метоцелем). Этот метод описан в табл. 2. Преимущество высева в метоцель связано с тем, что, поскольку среду не меняют, вторичных колоний в результате размножения первоначальных трансформантов не появляется. Таким образом, посев в метоцель — более количественный метод. Кроме того, поскольку не требуется повторных смен среды, он и менее трудоемок, и значительно более дешев. Метоцельный метод можно применять для любого селектируемого маркера и любой клеточной линии, растущей в метоцеле (т. е. для клеток, рост

которых зависит от подложки), или для отбора доминантных трансформирующих генов (разд. 3.2). В таких случаях нужно подобрать соответствующую ростовую среду (разд. 3.1 и 3.2).

Экспрессия донорной ДНК в реципиентных клетках зависит от нескольких факторов, которые мы сейчас и рассмотрим.

2.1.1. Донорная ДНК

В качестве донора можно использовать ДНК любого происхождения, если в ней присутствуют регуляторные последовательности, необходимые для экспрессии генов в клетках млекопитающих (разд. 3 и 5).

Таблица 3. Выделение высокомолекулярной хромосомной ДНК

1. Приготовьте следующие растворы:
   Гуанидинийхлоридный буфер
   Гуанидинийхлорид 76,40 г
   Ацетат натрия·$3H_2O$ 0,272 г
   ЭДТА·Na_2 1,86 г
   Дистиллированная вода до 90 мл
   Нагрейте смесь до 65 °С, чтобы растворились все компоненты, затем охладите ее до комнатной температуры.
   Доведите pH до 7,0 с помощью 5М NaOH. Добавьте 5 мл 2-меркаптоэтанола. Доведите объем до 100 мл дистиллированной водой. Конечные концентрации компонентов этого буфера: 8 М гуанидин-HCl, 20 мМ ацетат натрия, 50 мМ ЭДТА, 0,7 М 2-меркаптоэтанол.
   Буфер А
   Этот буфер имеет следующий состав: 10 мМ NaCl, 10 мМ ЭДТА, 0,5%-ный ДСН, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0; он готовится непосредственно перед употреблением из концентрированных растворов.
   Забуференный фосфатом солевой раствор (PBS)
   NaCl 8,0 г
   KCl 0,2 г
   Na_2HPO_4 1,15 г
   KH_2PO_4 0,2 г
   Дистиллированная вода до 1 л
2. Соберите клетки, подсчитайте их и промойте PBS, проводя центрифугирование.
3. Ресуспендируйте $1—2 \cdot 10^8$ клеток в 5 мл гуанидинийхлоридного буфера. Перемешайте, несильно встряхивая.
4. Осторожно, вручную, гомогенизируйте клетки 8—10 движениями неплотно притертого пестика в гомогенизаторе Даунса. Если ДНК выделяют из кусочков ткани, может понадобиться измельчить их с помощью гомогенизатора Omnimixer.
5. Добавьте 0,5 мл 20%-ного ДСН (особо чистого, BDH Chemical Co.), прогрейте при 65 °С 1—3 мин и тщательно, но осторожно перемешайте.
6. Осадите ДНК добавлением равного объема изопропанола. Если соль выпадет в осадок и раствор помутнеет, добавляйте 50%-ный изопропанол в дистиллированной воде до тех пор, пока раствор не станет почти прозрачным.
7. Намотайте ДНК на стеклянную палочку и промойте ее последовательно 70- и 100%-ным этанолом.
8. Высушите ДНК в вакуумном лиофилизаторе в течение 5 мин.

9. Растворите ДНК в 5 мл буфера А, содержащем 50 мкг/мл протеиназы К (Boehringer). Проинкубируйте при 37 °С в течение ночи.
10. Трижды экстрагируйте ДНК равным объемом хлороформа, разделяя фазы центрифугированием (10 000 *g*).
11. К водному раствору ДНК добавьте 5М NaCl до конечной концентрации 0,2М, а затем равный объем изопропанола.
12. Намотайте ДНК на стеклянную палочку, промойте и высушите ее, следуя пп. 7 и 8. ДНК можно осадить также центрифугированием (10 000 *g*) и высушить, как указано в п. 8.
13. Растворите ДНК в буфере 0,1 мМ ЭДТА, 1,0 мМ трис-HCl, pH 8,0.

Таблица 4. Выделение рекомбинантной плазмидной ДНК[1]

1. Приготовьте следующие растворы:

L-бульон

NaCl	5 г
Триптон (Difco)	5 г
Дрожжевой экстракт (Difco)	2,5 г

Дистиллированная вода до конечного объема 500 мл.
Простерилизуйте эту среду автоклавированием.

Лизисный буфер

1 М глюкоза	2,5 мл
1 М трис-HCl, pH 8,0	1,25 мл
0,2 М ЭДТА, pH 8,0	2,5 мл
Лизоцим (Sigma)	250 мг

Дистиллированная вода до конечного объема 50 мл.

Щелочной раствор

5 М NaOH	3,2 мл
10%-ный ДСН	8,0 мл

Дистиллированная вода до конечного объема 80 мл.

Нейтрализующий раствор

Растворите 11,8 г ацетата калия в ~30 мл воды и доведите pH до 5,0 добавлением приблизительно 5 мл ледяной уксусной кислоты. Добавьте дистиллированную воду до конечного объема 40 мл.

2. Посейте бактерии в 500 мл L-бульона во флаконе на 2 л. В среду должен быть внесен соответствующий антибиотик в зависимости от используемой плазмиды (например, ампициллин) до конечной концентрации 100 мкг/мл. Проинкубируйте культуру в течение ночи при 37 °С, энергично встряхивая ее.
3. Соберите бактерии центрифугированием при 5000 *g* в течение 10 мин при 4 °С. Слейте супернатант.
4. Ресуспендируйте осадок клеток в 100 мл охлажденного во льду 50 мМ трис-HCl, pH 8,0. Отцентрифугируйте бактериальные клетки, следуя п. 3. Такой клеточный осадок можно хранить при —20 °С.
5. Ресуспендируйте клеточный осадок в 50 мл лизисного буфера и поставьте на 30 мин в ледяную баню.
6. Добавьте 80 мл щелочного раствора (приготовленного согласно п. 1), хорошо перемешайте. Клеточная суспензия должна просветлеть после лизиса клеток. Оставьте во льду на 5 мин.
7. Добавьте 40 мл нейтрализующего раствора. Хорошо перемешайте и оставьте во льду на 15 мин.
8. Отцентрифугируйте при 5000 *g* в течение 10 мин и профильтруйте супернатант через марлю.
9. Добавьте 100 мл холодного (4 °С) изопропанола. Перемешайте и сразу отцентрифугируйте этот раствор при 5000 *g* в течение 10 мин. Слейте супернатант и высушите осадок (табл. 3, п. 8).

10. Растворите осадок в 10,8 мл 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0. Добавьте 11,7 г CsCl и прогрейте смесь при 37 °С в течение 10 мин для растворения CsCl. Далее добавьте 1,2 мл раствора бромистого этидия в концентрации 3 мг/мл. Хорошо перемешайте и отцентрифугируйте раствор в двух пробирках по 10 мл в подходящем роторе при 140 000 *g* 40 ч при 15 °С.
11. После центрифугирования вы увидите в УФ-свете (305 нм) зоны, где сконцентрировалась ДНК. Отберите материал нижней зоны, проколов шприцем стенку пробирки. Это и будет кольцевая замкнутая плазмидная ДНК.
12. Удалите из препарата ДНК бромистый этидий, проведя три экстракции равными объемами изопропанола. После каждой экстракции доводите объем раствора ДНК до исходного дистиллированной водой.
13. Отдиализуйте раствор ДНК против буфера следующего состава: 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0, для того, чтобы избавиться от CsCl.

[1] Этот метод (согласно работе [5]) позволяет получить не менее 1 мг рекомбинантных плазмид на 500 мл бактериальной культуры. Альтернативный метод описан в гл. 7, табл. 8, а метод выделения плазмид из малого количества культуры — в гл. 6, табл. 10.

1. Если донорной ДНК является геномная ДНК, выделенная непосредственно из эукариотических клеток, то важно, чтобы она была высокомолекулярной, поскольку для большинства генов эукариот характерно наличие интронов, и поэтому длина одного гена может составлять до 60 kb. Метод выделения высокомолекулярной хромосомной ДНК описан в табл. 3.

2. Если донором должна служить рекомбинантная плазмидная ДНК, то наилучший способ ее выделения из бактерий — метод щелочной экстракции с последующей очисткой в градиенте CsCl (табл. 4). При этом ДНК получается достаточно чистой и для эффективной трансформации не требуется ее дальнейшей обработки.

3. Применяя кальций-фосфатный метод, можно использовать фаг λ как таковой без предварительного выделения фаговой ДНК. В принципе этот метод очень эффективен. Рекомбинантные фаги, содержащие гены эукариот, использовались в экспериментах по биохимической трансформации (см. разд. 3.1 и работу [6]), например в экспериментах по переносу гена *tk*, содержащегося в вирусе HSV-1.

Чаще всего для переноса генов в качестве донора используются последовательности ДНК, клонированные в рекомбинантных плазмидах; именно на их примере мы и рассмотрим методы, описанные в этой главе.

2.1.2. ДНК-носитель

В качестве ДНК-носителя в экспериментах по трансформации клеток можно использовать ДНК тимуса теленка или ДНК спермы лосося, имеющиеся в продаже. Предварительно они должны быть очищены методом, описанным в табл. 5. Кроме

Таблица 5. Дополнительная очистка коммерческих препаратов ДНК

1. Приготовьте раствор ДНК в концентрации 1,0 мг/мл в 10 мМ трис-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0.
2. Добавьте 5 М NaCl до конечной концентрации 0,2 М и затем сверху наслоите 2,5 объема охлажденного во льду этанола. Намотайте ДНК на стеклянную палочку, медленно вращая ее и перемещая по границе раздела фаз.
3. Промойте ДНК охлажденным во льду 70%-ным этанолом, покручивая в нем стеклянную палочку с намотанной на нее ДНК, 1 мин. Высушите ДНК (табл. 3, п. 8).
4. Растворяйте ДНК в 1 мМ трис-HCl, 0,1 мМ ЭДТА, pH 8,0, в течение ночи.

того, ДНК-носитель можно выделить из эукариотических клеток с помощью метода, представленного в табл. 3 или описанного в работе [7]. Использование эукариотической ДНК-носителя, полученной в лаборатории, обычно позволяет повысить эффективность в 2—3 раза по сравнению с таковой для ДНК, имеющейся в продаже. Геномную ДНК прокариот не рекомендуется использовать в качестве носителя, поскольку она может ингибировать трансформацию клеток млекопитающих [8].

Если при использовании данной ДНК-носителя получается грубый осадок ДНК — фосфат кальция (разд. 2.1) и в результате эффективность переноса генов падает, необходимо уменьшить молекулярную массу ДНК-носителя механическим путем (например, пропустить препарат ДНК пять раз через иглу для инъекций № 19). Следует помнить, однако, что если средняя мол. масса ДНК-носителя становится меньше 10 kb, наблюдается значительное снижение эффективности поглощения клетками клонированной ДНК и ее экспрессии.

2.1.3. Реципиентные клетки

Клетки разных линий заметно различаются по эффективности поглощения экзогенной ДНК и ее экспрессии. Наилучшие результаты получены на L-клетках мыши (LA-клетки), фибробластах мыши NIH3T3 и фибробластах почек детеныша хомячка (BHK). Для культур других клеток, в особенности для первичных культур, наблюдается в 10 и даже в 100 раз более низкая эффективность (рис. 4; разд. 2.1.6).

Наилучшие результаты в опытах по трансформации всегда получают на реципиентных клетках, находящихся в экспоненциальной фазе роста. Поэтому клетки в этой фазе трипсинизируют и пересевают при соответствующей плотности на свежую среду за 24 ч до добавления донорной ДНК. Менять среду непосредственно перед добавлением ДНК нет необходимости. Работая с клетками LATK$^-$ и BHKTK$^-$, мы онаружили, что оптимальные плотности посева для них составляют соответственно $1 \cdot 10^6$ и $5 \cdot 10^5$ клеток на флакон (с площадью роста 25 см^2).

2.1.4. Абсорбция копреципитата ДНК — фосфат кальция

Вначале в опытах по трансформации использовали довольно небольшие времена абсорбции — 0,5—4 ч [1, 9]. Однако детальный анализ показал, что наиболее высокая эффективность трансформации достигается при более длительной (до 24 ч) инкубации реципиентных клеток с суспензией [10]. На рис. 2 приведены данные по экспрессии *tk*-гена HSV-1 в клеточных линиях LATK⁻ и BHKTK⁻ при различных временах абсорбции. Донорной ДНК служила рекомбинантная плазмида pTK1 (рис. 1), несущая *tk*-ген HSV-1 в плазмиде pAT153.

2.1.5. Время предселективной экспрессии

О результатах опытов по переносу генов во многих случаях судят по изменению фенотипа клеток. Часто для этого бывает необходимо использовать селективную среду на специфический биохимический маркер (разд. 3). Полагают, что во многих случаях селекции должен предшествовать некий период экспрессии в неселективных условиях (предселективная экспрессия, табл. 1, п. 8). На рис. 3 приведена зависимость уровня трансформации, индуцированной *tk*-геном HSV-1, клеток с фенотипом LATK⁻

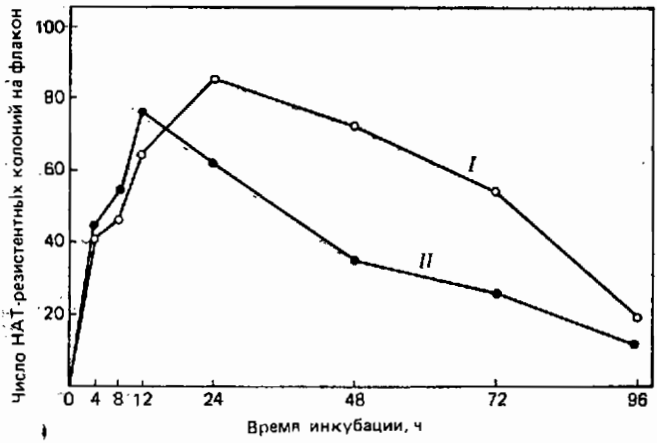


Рис. 2. Влияние продолжительности инкубации реципиентных клеток с донорной ДНК на эффективность трансформации. Мышиные клетки LATK⁻ (*I*) или клетки сирийского хомячка BHKTK⁻ (*II*), растущие во флаконах (с площадью роста 25 см²), инкубировали с донорной ДНК pTK1 (40 нг) и носителем — ДНК спермы лосося (10 мкг). Плазмида pTK1 является рекомбинантом, содержащим *Bam*HI-фрагмент ДНК HSV-1 (3,5 kb), в который по *Bam*HI-сайту плазмиды pAT153 встроен ген *tk* (см. работу [2] и рис. 1). Время предселективной экспрессии составляло 24 ч (рис. 3). Каждая точка отвечает среднему числу резистентных к НАТ колоний, приходящихся на один флакон, по данным для пяти флаконов.

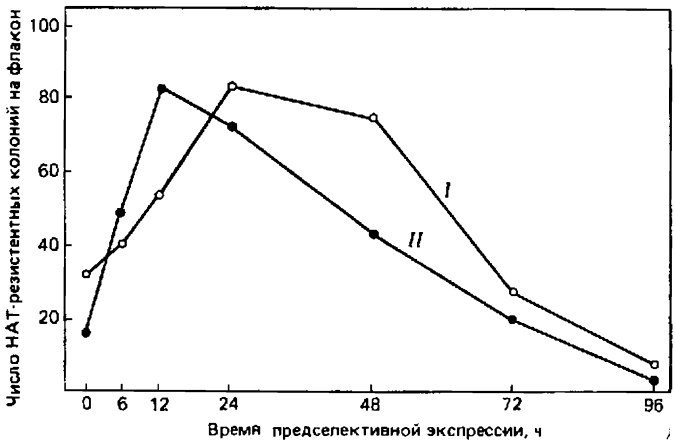


Рис. 3. Влияние времени предселективной экспрессии на уровень трансформации. Клетки LATK⁻ (*I*) или BHKTK⁻ (*II*) инкубировали с pTK1 (40 нг) и носителем — ДНК спермы лосося (10 мкг) в течение 24 и 12 ч соответственно. Каждая точка отвечает среднему числу резистентных к НАТ колоний, приходящихся на один флакон, по данным для пяти флаконов.

в клетки LATK⁺ от времени предселективной экспрессии. Частота трансформации максимальна при временах предселективной экспрессии 24—48 ч для клеток LATK⁻ и 12—24 ч для клеток BHKTK⁻. Через 48 ч эффективность трансформации снижается, возможно, из-за деградации донорной ДНК. Подобные тесты необходимо проводить, чтобы определить оптимальные условия для данных селектируемых маркеров и данных реципиентных клеток.

2.1.6. Кривые «доза — ответ»

Уровень генной экспрессии зависит от количества донорной ДНК, используемой для трансфекции клеток млекопитающих. Например, в экспериментах по получению стабильно трансформированных клеток, где используются биохимически селектируемые маркеры типа *tk*-гена HSV, число колоний трансформированных клеток увеличивается с дозой гена. На рис. 4 показана типичная кривая «доза — ответ» для гена *tk* при времени абсорбции 24 ч и времени предселективной экспрессии 24 ч. Кривые «доза — ответ» неодинаковы для разных генов и меняются в зависимости от таких факторов, как эффективность сигналов регуляции транскрипции данного гена. Из рис. 4 видно также, что реципиентные клетки различаются по своей способности к включению и экспрессии экзогенной ДНК; заметно

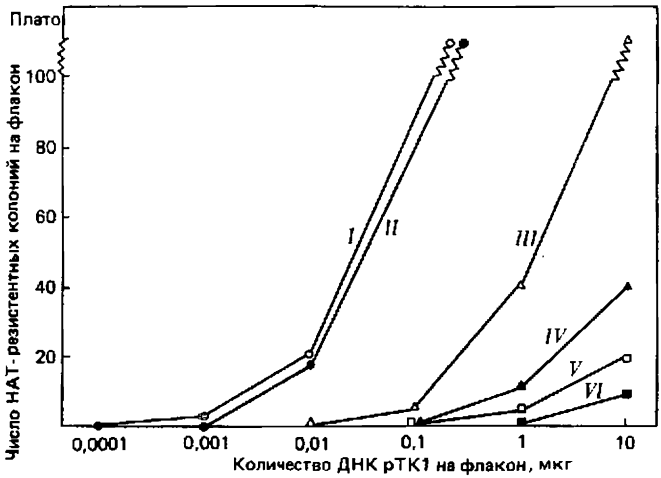


Рис. 4. Кривые «доза — ответ» для трансформации плазмидой pTK1. Реципиентами служили клетки мыши LATK⁻ (*I*), сирийского хомячка BHKTK⁻ (*II*), крысы 4TK⁻ (*III*), китайского хомячка CHOTK⁻ (*IV*), человека 143TK⁻ (*V*), эритролейкемические клетки мыши F4-12B2TK⁻ (*VI*). В каждом случае конечная концентрация ДНК на этапе соосаждения с фосфатом кальция составляла 20 мкг/мл. Поэтому, если рекомбинантной ДНК было не более 1 мкг, в смесь добавляли ДНК спермы лосося в качестве носителя. Каждая точка отвечает среднему числу резистентных к HAT колоний на флакон по данным для 4—8 флаконов.

различается у них и эффективность трансформации. Эти эффекты наблюдались даже для разных клонов, выделенных из одной и той же линии клеток.

2.1.7. Вещества, повышающие эффективность трансформации

Известно несколько химических «усилителей» экспрессии донорной ДНК в реципиентных клетках [2, 11—13]. В табл. 6 перечислены такие вещества, повышающие эффективность трансформации различных клеточных линий. «Усилитель» обычно добавляют через 4—8 ч после абсорбции копреципитата ДНК — фосфат кальция. Некоторые вещества, такие, как ДМСО, значительно увеличивают уровень экспрессии экзогенной ДНК в одних клетках, но проявляют токсический эффект в отношении других. Оптимальную концентрацию «усилителя», оптимальное время обработки им клеток и время после трансфекции следует эмпирически определять для каждого нового вещества, повышающего эффективность трансформации, и для каждой новой клеточной линии. Типичные кривые, иллюстрирующие влияние ДМСО на инфекционность ДНК HSV, приведены на рис. 5.

Таблица 6. Вещества, повышающие эффективность трансформаций различных клеточных линий

Вещество, повышающее эффективность трансформации	Донорная ДНК	Реципиентные клетки	Повышение эффективности трансфекции по сравнению с контролем	Ссылки
ДМСО	HSV-1	ВНК	10—100	[11]
	HSV-*tk*	Мышиные эритролейкемические	20	[2]
Глицерол	HSV-*tk*	то же	25	[2]
	SV40	Клетки почек обезьяны	10—200[1]	[12]
Колхицин	HSV-2	Клетки почек кролика	6	[13]
Колцемид	HSV-2	То же	4	[13]
Цитохалазин D	HSV-2	»	4	[13]
Колхицин+ колцемид+ цитохалазин D	HSV-2	»	27	[13]

[1] В этом случае использовался липосомный метод (разд. 2.4), а во всех других перечисленных здесь работах — кальций-фосфатный метод (разд. 2.1).

2.1.8. Котрансформация

Метод котрансформации был разработан для введения и экспрессии в клетках млекопитающих последовательностей ДНК, не кодирующих никаких селектируемых маркеров [14]. Чтобы

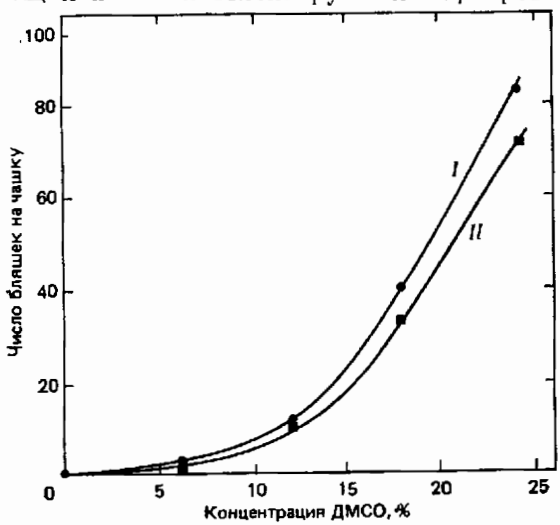


Рис. 5. Влияние ДМСО на инфекционность ДНК HSV-1 [11]. Клетки ВНК инфицировали вирусной ДНК (0,04 мкг на чашку) и инкубировали в течение 4 мин в присутствии ДМСО различной концентрации в HEPES-солевом растворе (*I*) или в среде Игла (*II*).

получить контрансформанты, реципиентные клетки инкубируют с донорной ДНК и одновременно с другой ДНК, кодирующей какой-либо селектирусмый маркер, например содержащий *tk*-ген HSV. Трансформацию реципиентных клеток и отбор проводят как обычно. Отбирают ТК$^+$-трансформанты (табл. 1 и 2) и проверяют их на котрансформацию методом гибридизации с гибридизационной пробой или каким-либо другим доступным методом.

Опыты по котрансформации с *tk*-геном HSV-1 и бактериофагом ϕX174, или плазмидой pBR322, или клонированным геном β-глобина кролика [14] позволили получить линии мышиных клеток, содержащих множественные копии котрансформирующих генов. Частота котрансформации очень велика: котрансформирующую ДНК содержат свыше 90% трансформантов. С помощью такой системы котрансформации можно осуществить введение и стабильную интеграцию практически любого выбранного гена в культивируемые клетки, не прибегая к «сшиванию» данного гена с ДНК какого-либо вектора или с генами, кодирующими биохимически селектируемые маркеры.

2.2. ДЭАЭ-декстрановый метод

ДЭАЭ-декстрановый метод впервые был разработан для исследования инфекционности РНК полиовируса [15] и в дальнейшем был распространен на изучение инфекционности ДНК SV40 [16] и вируса полиомы [17]. Для этих вирусов данный метод до сих пор является наиболее предпочтительным. С помощью ДЭАЭ-декстранового метода была исследована также инфекционность других вирусных ДНК (вирусов ВК, AAV-1, аденовируса 5, HSV-1).

Существуют две основные разновидности этого метода [18]. В первом случае вирусную ДНК смешивают с ДЭАЭ-декстраном и смесь добавляют к реципиентным клеткам. Во втором варианте реципиентные клетки предварительно обрабатывают растворами ДЭАЭ-декстрана и затем инкубируют с вирусной ДНК. В обоих случаях реципиентные клетки промывают изотоническим солевым раствором до и после инкубации с ДНК или с ДНК+ДЭАЭ-декстраном. Используемая концентрация ДЭАЭ-декстрана варьирует от 100 до 1000 мкг/мл в зависимости от свойств реципиентных клеток и выбранной методики. При стандартных методах трансфекции трансфицируется лишь небольшая часть клеток обезьяны (~4%), инкубированных с ДНК SV40. Однако если использовать разработанные недавно новые методики, в которых инкубация клеток обезьяны BSC-1 с ДНК в присутствии низких концентраций ДЭАЭ-декстрана производится более продолжительное время, чем ранее [19], то полу-

Таблица 7. ДЭАЭ-декстрановый метод эффективного инфицирования клеток обезьяны с помощью ДНК SV40 [19]

1. Посейте $3 \cdot 10^5$ клеток обезьяны BSC-1, находящихся в логарифмической фазе роста, на чашку Петри (3,5 см в диаметре) с 3 мл среды Игла в модификации Дульбекко (среда DME)[1], содержащей сыворотку теленка в концентрации 7%. Проинкубируйте чашку при 37 °С 24 ч в CO_2-инкубаторе.
2. Когда начнет образовываться монослой, промойте клетки дважды средой DME без сыворотки[2].
3. Проинкубируйте клетки с 0,7 мл сверхспиральной ДНК SV40 в концентрации 100 мкг/мл в среде DME, содержащей 50 мМ трис-HCl (pH 7,3), 200 мкг/мл ДЭАЭ-декстрана (мол. масса $2 \cdot 10^6$) при 37 °С в CO_2-инкубаторе.
4. Через 8 ч после инфицирования промойте клетки один раз средой DME без сыворотки и проинкубируйте их при 37 °С в среде DME, содержащей сыворотку теленка в концентрации 7%.
5. Затем либо подсчитайте число колоний, либо проверьте клетки на наличие временной экспрессии Т-антигена SV40.

Стандартный учет бляшек

а. Через сутки после инфицирования трипсинизируйте клетки, разбавьте их и посейте поверх клеток BSC-1, еще не образовавших сплошного монослоя, так, чтобы на каждую чашку Петри было посеяно достаточное число клеток для образования ~50 бляшек.

б. Проинкубируйте чашки при 37 °С в течение 2 ч, чтобы клетки прикрепились.

в. Слейте среду и замените ее средой DME, содержащей 2—5% сыворотки и 0,5% агара Нобля. Проинкубируйте чашки при 37 °С 6—8 сут.

г. Окрасьте клетки, наслоив на содержимое чашек по 3 мл 0,1%-ного нейтрального красного в среде DME, содержащей 0,5% агара Нобля. Бляшки можно будет увидеть и подсчитать на следующий день.

Временная экспрессия Т-антигена SV40

а. Через 8—24 ч после инфекции зафиксируйте клетки в смеси ацетон: метанол (9 : 1 по объему) при —70 °С 10 мин.

б. Проинкубируйте зафиксированные клетки с хомячковой антисывороткой к опухолевому антигену SV40 в термостате с увлажнением при 37 °С 30 мин.

в. Промойте клетки буфером PBS[3] 30 мин при 37 °С.

г. Проинкубируйте клетки 30 мин при 37 °С с козьими антителами к IgG хомячка, связанными с флуоресцеином, в присутствии бромистого этидия в конечной концентрации 2 мкг/мл.

д. Дважды промойте клетки буфером PBS и один раз дистиллированной водой.

е. Поместите клетки в смесь глицерол : PBS[3] (2 : 1 по объему) и просмотрите их под микроскопом в УФ-свете (ртутная лампа). При экспрессии опухолевого антигена SV40 будет наблюдаться флуоресценция клеток.

[1] Фирмы Gibco.
[2] Этот этап важен для получения высокой эффективности трансфекции.
[3] Состав этого буфера приведен в табл. 3, п. 1.

чаются более обнадеживающие результаты: при инкубации в течение 8 ч в присутствии 200 мкг/мл ДЭАЭ-декстрана воспроизводимо инфицируется 25% клеток. Эта более эффективная методика инфицирования клеток обезьяны BSC-1 с помощью ДНК SV40 описана в табл. 7.

Механизм действия ДЭАЭ-декстрана неизвестен. На этот счет было высказано несколько предположений, например, что ДЭАЭ-декстран связывается с ДНК и защищает ее от нуклеаз, или взаимодействует с клеточной мембраной и таким образом перемещает ДНК к клеточной поверхности, подготавливая ее к включению, или стимулирует пиноцитоз. Как бы то ни было, эта методика позволяет трансфицировать до 25% клеток ДНК SV40 [19], в то время как с помощью кальций-фосфатной методики трансфицируется в лучшем случае 15% клеток [20].

2.3. Микроинъекция

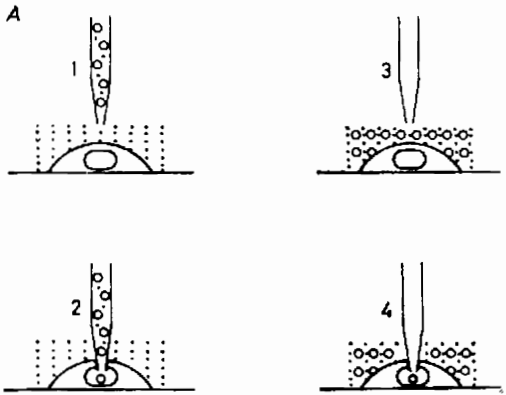
2.3.1. Истинная микроинъекция

Для введения рекомбинантных ДНК в клетки млекопитающих были разработаны методы микроинъекции нуклеиновых кислот с помощью стеклянных микропипеток [21—25]. Когда ДНК, несущую ген *tk*, инъецируют в LATK⁻-клетки мыши, у 50—100% клеток наблюдается временная тимидинкиназная

Таблица 8. Введение ДНК в клетки млекопитающих методом микроинъекции [24]

1. Вырастите реципиентные клетки на маленьких стеклянных покровных стеклах (площадь 1 см²).
2. Приготовьте стеклянные микропипетки из стеклянного капилляра (Omega Dot Tubing, 1,2 мм OD, W. P. Instruments) с помощью приспособления для вытягивания микропипеток (например, Model p 77 Brown-Flanning apparatus, Sutter Instruments). Диаметр кончиков стеклянных микропипеток должен быть порядка 0,1—0,5 мкм.
3. Подготовьте приспособление для микроинъекции следующим образом. Расположите микропипетку таким образом, чтобы микроинъекцию можно было проводить под прямым визуальным контролем на предметном столике инвертированного фазово-контрастного микроскопа (например, Leitz Diavert, объектив 400×). Перемещайте микропипетку с помощью микроманипуляторов (например, Narishige MO-15, снабженным гидравлическим микродвижком, перемещающим пипетку вдоль ее оси). Все это приспособление должно обеспечить подачу раствора ДНК из микропипетки в клетки под постоянным давлением при помощи шприца фирмы Hamilton (модель 8700).
4. Наберите раствор ДНК (0,1 мг/мл в PBS[1]) в микропипетку.
5. Пользуясь шприцем фирмы Hamilton, вводите раствор ДНК в клетки под постоянным давлением. Количество жидкости, вводимой в каждую клетку, контролируется с точностью $V/2 \leqslant V \leqslant 2V$ путем визуального наблюдения за изменением показателя преломления внутриклеточной среды по мере поступления жидкости в клетку и временем, в течение которого микропипетка находится в клетке.
6. После того как донорная ДНК введена в клетки, должна осуществляться предселективная экспрессия перенесенного гена (генов), и затем нужно отобрать трансформанты в соответствии с табл. 1.

[1] Состав буфера приведен в табл. 3, п. 1.



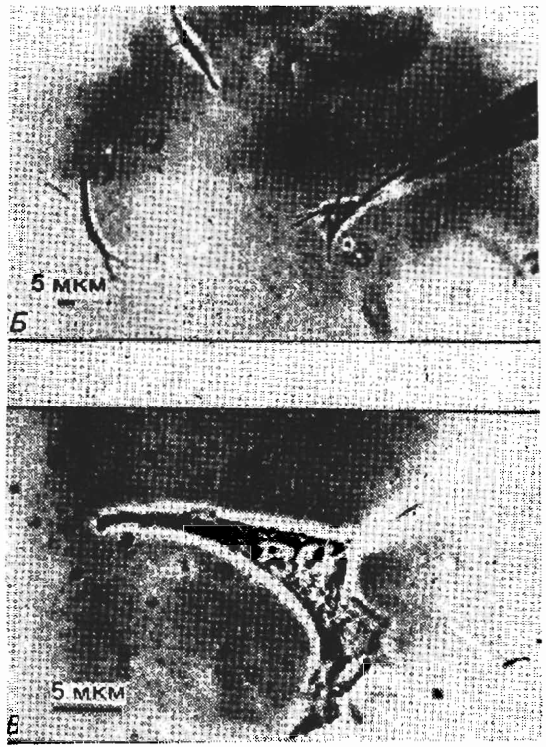


Рис. 6. *А*. Схематическое изображение процессов микроинъекции (1 и 2) и «прокалывания» (3 и 4). Молекулы ДНК изображены в виде светлых кружочков. Для микроинъекции раствором ДНК заполняют микропипетку, а при «прокалывании» ДНК находится в окружающей среде. *Б* и *В* — фотографии, на которых изображены клетки ВНКТК- в процессе прокалывания.

активность [24]. Количество получаемых стабильных трансформантов зависит от природы инъецированной рекомбинантной ДНК. Например, используя рекомбинантную ДНК pBR322/HSV-1, несущую ген *tk*, можно получить лишь одну стабильно трансформированную клетку на 500—1000 клеток, в которые вводилась эта ДНК. В то же время, если к рекомбинантной ДНК pBR322/HSV-1 *tk* присоединить специфические последовательности ДНК SV-40, частота трансформации повысится до 20% от числа клеток, в которые была осуществлена микроинъекция (см. также разд. 5.3).

Микроинъекцию в клетки млекопитающих можно проводить так, как это описано в табл. 8. Средний объем, инъецированный в каждую клетку (10—20 фемтолитров), определяют так. В 5000 клеток инъецируют [^{3}H]-dTTP (10 мкКи/мкл), промывают клетки буфером PBS и затем измеряют радиоактивность клеток с помощью сцинтилляционного счетчика. Для L-клеток этот объем составляет 1—2% объема клетки. В течение 1 ч можно провести инъекцию 500—1000 клеток, причем вероятность успешного переноса составляет 50—100% [24]. Аналогичные методы инъецирования макромолекул в культивируемые клетки млекопитающих описаны в работах [21—23]. Процедура микроинъекции схематически изображена на рис. 6.

2.3.2. «Прокалывание»

Одним из вариантов стандартного метода микроинъекции является метод «прокалывания», при котором ДНК механически вводят в ядра культивируемых клеток [25]. Этот метод описан в табл. 9 и проиллюстрирован на рис. 6. Клетки в логарифмической фазе роста обрабатывают трипсином и ЭДТА, промывают средой и затем рассевают по $1—5 \cdot 10^3$ клеток на чашки Петри диаметром 6 см и инкубируют при 37 °С в течение ночи. Непосредственно перед «прокалыванием» среду сливают и клетки промывают два раза буфером PBS, pH 7,2, а затем наслаивают буфер PBS, содержащий донорную ДНК в концентрации 5—1000 мкг/мл. Все клетки в определенном помеченном секторе чашки «прокалывают» один раз в области ядра стеклянной микроиглой, пока кончик микроиглы не коснется подложки. Клетки в других секторах чашки служат контролем. Сразу после «прокалывания» среду заменяют нормальной ростовой средой, чтобы провести предселекцию, затем ее в свою очередь заменяют подходящей селективной средой.

Введение ДНК, суспендированной во внешней среде, в ядра реципиентных клеток при «прокалывании» было продемонстрировано для LATK$^-$-клеток мыши с донорной ДНК HSV-1, не-

Таблица 9. Введение ДНК в клетки млекопитающих методом «прокалывания» [25]

1. Сделайте микроиглы из стеклянных капилляров с помощью приспособления для вытягивания микроэлектродов (например, Narishige PN-3 в следующем режиме: нагреватель «8», магнит «10», главная мишень «10»). Диаметр кончика микроиглы должен быть порядка 0,1 мкм.
2. Трипсинизируйте клетки, находящиеся в логарифмической фазе роста, обработав их 0,25%-ным трипсином в присутствии 0,02%-го ЭДТА в течение 15 мин при 37 °С.
3. Промойте трипсинизированные клетки свежей средой.
4. Суспендируйте клетки в свежей среде и определите концентрацию клеток в суспензии.
5. Посейте по 100—200 клеток на помеченный участок (площадью ~0,5 см²) каждой чашки Петри.
6. Проинкубируйте клетки 5 ч при 37 °С, чтобы они смогли прикрепиться к подложке.
7. Непосредственно перед «прокалыванием» слейте среду и промойте клетки дважды 100 мкл буфера PBS[1].
8. Наслоите на клетки 50 мкл PBS, содержащего ДНК в концентрации 5—1000 мкг/мл.
9. С помощью микроскопа с манипулятором (инъектоскопа) (например, Olympus IMI-YF, type 1) «проколите» клетки. Зафиксируйте микроиглу в держателе, находящемся в углублении, перпендикулярно оптической оси конденсора. «Проколите» клетки движением конденсорной линзы вверх-вниз.
10. После «прокалывания» замените среду нормальной ростовой средой и создайте условия для предселективной экспрессии перенесенных генов (табл. 1, п. 8).
11. Наконец, проведите селекцию по перенесенному гену, например, так, как это описано в табл. 1, пп. 9—11 для *tk*-гена.

[1] Состав этого буфера дан в табл. 3, п. 1.

сущей ген *tk*. Примерно у 25% клеток, «проколотых» в присутствии этой рекомбинантной ДНК, наблюдалась экспрессия гена *tk*, а 2% клеток становились $ТК^+$-трансформантами [25].

2.4. Липосомы как переносчики генов

Использование липосом для переноса генов и исследования их экспрессии подробно описаны в работах [12, 26, 27]. Уонг и др. [26] показали, что ген β-лактамазы из плазмиды pBR322 можно ввести в отрицательно заряженные липосомы с помощью обработки ультразвуком. При инкубации таких липосом с клетками различных культур в клеточных экстрактах появляется β-лактамазная активность. Позже перенос генов с помощью липосом был использован для трансформации $LATK^-$-клеток мыши рекомбинантной плазмидой, несущей *tk*-ген HSV-1 [27].

Для получения липосом с включенными в них ДНК лучше всего использовать метод выпаривания с обращением фазы (28); при этом образуются большие однослойные пузырьки с высокой

Таблица 10. Приготовление и использование липосом, содержащих ДНК [27]

Приготовление липосом, содержащих ДНК

1. Смешайте фосфатидилсерин и холестерол (Sigma) в молярном отношении 1 : 1. Для этого растворите по 10 микромолей каждого компонента в 1 мл диэтилового эфира.
2. Добавьте 0,33 мл буфера PBS[1], содержащего 20—200 мкг рекомбинантной плазмидной ДНК.
3. Подвергните эту двухфазную систему кратковременной обработке ультразвуком (10 с), используя ультразвуковой излучатель B-15 Branson Sonifier с микронасадкой, установленный на 500 мс. После такой обработки получится гомогенная эмульсия.
4. Удалите эфир, перелив эмульсию во вращающуюся колбу, соединенную с лиофильным испарителем. В результате получится гомогенная опалесцирующая суспензия липосом.
5. Отделите свободную, т. е. не попавшую в липосомы, ДНК центрифугированием препарата при 100 000 *g* 30 мин. Обычно около 10—20% ДНК включается в липосомы.
6. Ресуспендируйте осадок (липосомы, содержащие ДНК) в 1 мл PBS.

Трансфекция с использованием липосом, содержащих ДНК

1. Приготовьте серийные разведения суспензии липосом в ростовой среде.
2. Добавьте по 100 мкл липосом, содержащих 10—500 нг ДНК, прямо во флаконы с реципиентными клетками (площадь роста 25 см^2), подготовленными в точности так, как описано в табл. 1 для кальций-фосфатного метода трансфекции.
3. Оставьте липосомы с клетками на ночь в термостате при 37 °С.
4. Отберите стабильные трансформанты. Методика отбора зависит от маркерного гена, по которому должна проводиться селекция (разд. 3 и 5, табл. 1, 2, 15 и 16). Можно также исследовать временную экспрессию (разд. 5.1).

[1] Состав этого буфера приведен в табл. 3, п. 1.

эффективностью включения ДНК. Этот метод детально описан в табл. 10; там же приведены данные по использованию липосом, содержащих ДНК, для трансфекции клеток млекопитающих.

Потенциальные возможности метода переноса ДНК в клетки млекопитающих с помощью липосом были тщательно исследованы в случае клеток почек обезьяны и ДНК SV40 [12]. За включением ДНК, проявляющемся в образовании вирусных частиц, можно следить с помощью чувствительных методов бляшек и флуоресцентного анализа. ДНК SV40, заключенная в липосомы, по крайней мере в 100 раз более инфекционна ($1{,}8 \cdot 10^3$ БОЕ/мкг ДНК), чем изолированная ДНК. Однако ее инфекционность значительно меньше той, которую можно получить ($5 \cdot 10^6$ БОЕ/мкг ДНК), используя ДЭАЭ-декстрановый метод (разд. 2.2). Инфекционность ДНК, включенной в липосомы, можно повысить в 10—200 раз, обработав клетки через 30 мин после добавления липосом полиэтиленгликолем или глицеролом в высокой концентрации в течение 90 с [12]. Хотя и в этом случае эффективность липосомного метода остается

в 10 раз ниже ДЭАЭ-декстранового, он обладает такими преимуществами, как низкая токсичность и возможность применения in vivo. Захват липосом клетками, по-видимому, осуществляется путем эндоцитоза, а не в результате слияния липосом с клеточной мембраной [29].

2.5. Слияние протопластов

Метод, с помощью которого, возможно, удастся преодолеть сложности включения ДНК в клетки млекопитающих и ее экспрессии, — метод слияния протопластов — был впервые описан в работе [30]. Он основан на слиянии протопластов, которые получены из *Escherichia coli*, содержащих молекулы рекомбинантных ДНК, с культивируемыми эукариотическими клетками в присутствии полиэтиленгликоля, способствующего слиянию. За прошедшие годы этот метод был настолько усовершенствован, что введение экзогенной ДНК и временная ее экспрессия

Таблица 11. Методика проведения слияния протопластов [31]

1. Вырастите культуру клеток *E. coli*, несущих рекомбинантные плазмиды, до концентрации $2 \cdot 10^8$ клетка/мл.
2. Проинкубируйте культуру в присутствии хлорамфеникола (конечная концентрация 200 мкг/мл) в течение ночи, чтобы произошла амплификация плазмид[1].
3. Отцентрифугируйте пробы культуры объемом по 10 мл при 5000 *g* 10 мин и каждый осадок бактерий ресуспендируйте в 100 мкл охлажденного во льду раствора следующего состава: 20%-ная сахароза, 50 мМ трис-HCl, pH 8,0.
4. Добавьте 20 мкл свежеприготовленного лизоцима (10 мг/мл; Boehringer) и оставьте суспензию во льду на 10 мин.
5. Добавьте 50 мкл 0,25 М ЭДТА и разбавьте каждую суспензию путем постепенного добавления 1,3 мл буфера, содержащего 9%-ную сахарозу, 50 мМ трис-HCl, pH 8,0.
6. Реципиентные клетки должны расти на среде Игла в модификации Дульбекко (среда DME, Gibco) в чашках Петри диаметром 3,5 см до плотности культуры $2 \cdot 10^5$ клеток на чашку.
7. Слейте среду и промойте реципиентные клетки один раз 2 мл солевого раствора, забуференного трис-HCl (0,15 М NaCl, 20 мМ трис-HCl, pH 7,2).
8. Добавьте 2 мл препарата протопластов *E. coli* (см. п. 5) к каждой чашке и отцентрифугируйте протопласты на слой клеток (1500 об/мин, 3 мин) в большом бакет-роторе на настольной центрифуге.
9. Слейте супернатант и добавьте 0,5 мл 48%-ного (по весу) полиэтиленгликоля (ПЭГ 1000) в среде DME. Проинкубируйте при комнатной температуре 1 мин.
10. Осторожно промойте клетки пять раз солевым раствором, забуференным трис-HCl.
11. Добавьте свежую ростовую среду (среда DME, содержащая сыворотку новорожденного теленка в концентрации 10%). Проинкубируйте при 37 °С.
12. Меняйте среду каждый день. Через 10 сут проверьте культуры на наличие трансформированных колоний.

[1] Нужный для амплификации антибиотик зависит от используемой рекомбинантной плазмиды.

осуществляются со 100%-ной вероятностью [31]. После переноса ДНК, содержащей ранние гены вируса полиомы или SV40, эффективность образования фокусов трансформации по крайней мере не меньше, чем после инфицирования вирусными частицами. В оптимальных условиях перенос при слиянии, по-видимому, происходит с эффективностью, в 10—20 раз большей, чем введение ДНК в клетки млекопитающих с помощью кальций-фосфатной методики. Метод слияния протопластов описан в табл. 11.

2.6. Другие методы переноса генов

2.6.1. Перенос генов с помощью хромосом

Перенос генов с помощью хромосом состоит во введении метафазных хромосом в реципиентные клетки. Изолированные метафазные хромосомы обычно переносят либо кальций-фосфатным методом [32, 33], либо с помощью включения их в липосомы [34]. Эта система в принципе может быть очень эффективной, но ситуация осложняется тем, что пока отсутствуют способы длительного хранения хромосом и включения в них клонированной ДНК. Если бы удалось включить клонированную ДНК в структуры, содержащие сигнальные последовательности, регулирующие стабильную сегрегацию и передачу генетической информации, то потенциальные возможности такой системы были бы столь велики, что многие дальнейшие исследования велись бы именно в этом направлении.

2.6.2. Упаковка in vitro ДНК вирусов эукариот

Большого внимания заслуживают также системы переноса, основанные на упаковке in vitro последовательностей ДНК вирусов эукариот, аналогичные системам на основе фага λ в случае прокариот. Недавно был описан перенос генов с помощью частиц, подобных вирусу полиомы [35].

2.6.3. Использование электростимуляции

Введение экзогенной ДНК в клетки с помощью электростимуляции было описано еще в 1982 г. [36], однако этот метод еще не настолько хорошо разработан, чтобы рассматривать возможность применения его на практике.

2.7. Выбор метода переноса генов

Очевидно, что выбор метода зависит от поставленной задачи. В большинстве случаев оптимальным является кальций-фосфатный метод с использованием клонированной ДНК или ДНК, выделенной непосредственно из эукариотических клеток.

Это достаточно простой, быстрый, хорошо воспроизводимый и весьма эффективный метод. Применение ДЭАЭ-декстрана рекомендуется только в некоторых частных случаях, таких, как трансфекция полиовирусной РНК или ДНК паповавирусов. Сложившееся ранее представление, что при микроинъекции достигается значительно бо́льшая эффективность переноса, чем в случае кальций-фосфатной методики, возможно, придется пересмотреть в свете новых исследований, проведенных с более точным сравнением эффективности. Однако, если число реципиентных клеток ограничено или если донорной ДНК очень мало, микроинъекция дает реальные преимущества. Липосомный метод заведомо более сложный, чем кальций-фосфатный, и не более эффективный. Возможно, липосомы окажутся полезными в некоторых опытах in vivo, но и это предположение нужно еще подтвердить. Метод слияния протопластов, вероятно, более эффективен, чем кальций-фосфатная преципитация, и может послужить основой для прямого скрининга библиотек рекомбинантных плазмид по экспрессии включенных генов в клетках эукариот.

3. Селектируемые маркеры

Селектируемые маркеры — это гены, экспрессия которых в клетках дает возможность проводить позитивную селекцию. В узком смысле они кодируют такие генные продукты (биохимические маркеры), присутствие которых может быть выявлено путем введения в ростовую среду простых химических соединений, и являются, таким образом, чрезвычайно полезными для отбора трансформантов в экспериментах по переносу генов (разд. 2). Однако отбор можно проводить и по многим другим фенотипическим признакам, например по способности к росту в агаре или по снижению потребности в сыворотке (их обусловливают доминантные трансформирующие гены, изменяющие регуляцию роста). Использование селектируемых маркеров позволило глубже понять механизмы трансфекции и дало возможность получить системы для анализа регуляции транскрипции. Несколько селектируемых генов, имеющих практическое применение, описаны в разд. 3.1, а доминантные трансформирующие гены, изменяющие регуляцию роста, рассмотрены в разд. 3.2.

3.1. Биохимические маркеры

3.1.1. Тимидинкиназа

Гены тимидинкиназы (*tk*) экспрессируются в большинстве эукариотических клеток. Этот фермент является участником дополнительного метаболического пути синтеза тимидиновых

Таблица 12. Определение активности тимидинкиназы, кодируемой HSV-1 [42]

1. Трипсинизируйте клетки и промойте их буфером PBS (табл. 3, п. 1).
2. Ресуспендируйте клетки до концентрации $0{,}2—2{,}0 \cdot 10^7$ клетка/мл в буфере 50 мМ трис-HCl, pH7,5, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 5 мкМ тимидин.
3. Разрушьте клетки ультразвуковой обработкой. При необходимости разрушенные клетки можно хранить при —70 °С. Анализируйте клетки на тимидинкиназную (ТК) активность в течение недели.
4. ТК-активность проверяйте в 100 мкл реакционной смеси, содержащей 5—20 мкл лизированных клеток, 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 10 мМ $MgCl_2$, 10 мМ АТР, 4,4 мкМ немеченный тимидин, 5 мкКи [^{3}H]-тимидина (удельная активность 30 Ки/моль) и 0,2 мМ TTP. TTP в такой концентрации ингибирует активность клеточной ТК, но не влияет на вирусную ТК. Проинкубируйте реакционную смесь при 37 °С.
5. Через 1, 2 и 4 ч отберите пробы по 25 мкл для определения степени превращения тимидина в TMP следующим образом.
6. *Первый способ*
   а) Добавьте к каждой пробе по 1 мл охлажденной во льду смеси: 4мМ формиат аммония (pH 6,0), 5 мкМ тимидин для того, чтобы остановить реакцию;
   б) нанесите каждую пробу на круглый фильтр DE81 (Whatman; диаметр 2,3 см) путем фильтрования с отсосом;
   в) промойте каждый фильтр два раза 2 мл охлажденного во льду раствора, содержащего фосфат аммония и тимидин;
   г) далее промойте каждый фильтр дважды 2 мл дистиллированной воды и затем этанолом; при этом тимидин отмоется, а фосфат тимидина останется на фильтре;
   д) высушите фильтры и определите радиоактивность с помощью сцинтилляционного счетчика.

   Второй способ
   а) нанесите капли реакционной смеси прямо на фильтры DE81, предварительно пронумерованные карандашом;
   б) сразу опустите фильтры в ледяную воду и хорошо промойте их большими объемами воды;
   в) промойте фильтры ацетоном, высушите их и определите связавшуюся радиоактивность с помощью сцинтилляционного счетчика.

нуклеотидов и катализирует превращение тимидина в тимидинмонофосфат. Получены ТК$^-$-мутанты ряда клеток в культуре ([37—39]; см. также рис. 4). Селективная среда для отбора ТК$^+$-клеток (среда НАТ) была впервые описана в работах [40, 41]. Эта среда содержит гипоксантин, аминоптерин и тимидин. Аминоптерин ингибирует перенос одноуглеродных фрагментов и, таким образом, подавляет синтез TTP из dUMP, а также синтез dATP и dGTP de novo. Гипоксантин является субстратом дополнительного пути синтеза dATP и dGTP, поэтому в его присутствии эти нуклеотиды синтезируются. Однако в среде НАТ синтез TTP целиком зависит от экзогенного источника тимидина и от наличия активного *tk*-гена. Итак, среда НАТ является селективной для ТК$^+$-клеток. Обычный состав среды НАТ, пригодной для большинства клеток млекопитаю-

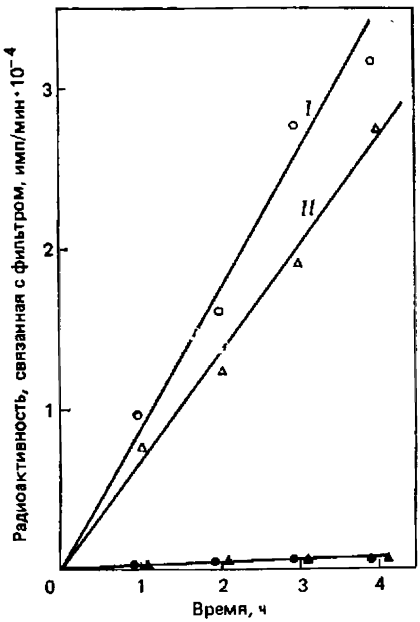


Рис. 7. Активность HSV-кодируемой тимидинкиназы в LATK+-клетках мыши и BHKTK+-клетках хомячка через 3—4 мес после трансформации рекомбинантной плазмидой pTK1. Активность ТК определяли в присутствии 0,2 мМ TTP в экстрактах, приготовленных из $1 \cdot 10^5$ клеток, по методу, описанному в табл. 12. *I* и *II* — ТК+-трансформанты клеток LAT-1 и BT-1 соответственно; темные кружки и темные треугольники — нетрансформированные клетки LATK⁻ и BHKTK⁻.

щих, и процедура отбора описаны в табл. 1. Таким образом, в ТК⁻-клетки могут быть введены гены тимидинкиназы и проведена селекция трансформантов ТК+ на среде НАТ. Наиболее известные ТК⁻-реципиенты — это LATK⁻-клетки мыши, характеризующиеся низким уровнем спонтанной реверсии и высокой эффективностью трансфекции. Лучше других изучен *tk*-ген HSV-1; проведено его клонирование и определена нуклеотидная последовательность.

Активный *tk*-ген HSV можно выявить в трансфицированных клетках с помощью различных методов обнаружения активной HSV-кодируемой тимидинкиназы [10, 42]. Исследование активности этого фермента, описанное в табл. 12, основано на измерении превращения меченого радиоактивного тимидина в тимидинфосфаты. Поскольку для фермента, кодируемого вирусной ДНК, субстратная специфичность и регуляция по типу обратной связи отличаются от таковых для «клеточного» фермента, остаточную «клеточную» активность в ТК⁻-клетках можно избирательно ингибировать путем добавления 0,2 мМ TTP, что позволяет измерять только активность HSV-кодируемой тимидинкиназы (рис. 7). Еще одним тестом на специфичность фермента может служить реакция с антисывороткой к тимидинкиназе HSV. Альтернативный способ выявления активного *tk*-гена HSV состоит в применении теста на присутствие *tk*-мРНК

Таблица 13. Выделение суммарной клеточной РНК[1]

1. Приготовьте следующие растворы:
   Гуанидинийхлорид
   Приготовление раствора описано в табл. 3
   Раствор CsCl (5,7 М CsCl, 50 мМ ЭДТА)
   CsCl (BRL, Ultrapure reagent) 47,98 г
   ЭДТА·Na_2 0,93 г
   Дистиллированная вода до конечного объема 50 мл
   Если необходимо, доведите показатель преломления раствора до 1,3995 добавлением сухого CsCl или дистиллированной воды.
   10×MOPS (0,2 М MOPS, 50 мМ ацетат натрия, 10 мМ ЭДТА, pH 7,0)
   MOPS (натриевая соль) 20,93 г
   Ацетат натрия·$3H_2O$ 3,40 г
   ЭДТА·Na_2 1,86 г
   Дистиллированная вода до конечного объема 500 мл.
   Доведите pH до 7,0 уксусной кислотой.
   Раствор LiCl — мочевина (4,0 М LiCl, 8,0 М мочевина)
   LiCl (BDH) 8,48 г
   Мочевина (Sequanal grade, Pierce Chemical Co.) 24,00 г
   Дистиллированная вода до конечного объема 50 мл.
2. Ресуспендируйте $1—2 \cdot 10^8$ клеток в 5 мл раствора гуанидинийхлорида и разрушьте их гомогенизацией в соответствии с табл. 3., п. 4.
3. Добавьте 0,5 мл 20%-го ДСН (особой чистоты, BDH) и прогрейте при 65 °С 1—3 мин.
4. Наслоите эту смесь поверх 3 мл подушки из раствора CsCl и отцентрифугируйте 48 ч при 140 000*g*, 15 °С, например, в угловом титановом роторе при 40 000 об/мин в 10 пробирках по 10 мл.
5. После центрифугирования удалите белок, собравшийся наверху, и выбросьте его. Отберите ДНК, расположенную полосой посредине пробирки, поскольку ее можно осадить изопропанолом и очистить для дальнейшего использования согласно табл. 3. РНК осаждается на дно пробирки.
6. Слейте из пробирки всю жидкость и растворите РНК в 0,7 мл дистиллированной воды.
7. Перенесите этот раствор РНК в пробирку от микроцентрифуги и сразу добавьте 0,7 мл раствора LiCl — мочевина.
8. Перемешайте раствор и оставьте его на ночь при 4 °С для осаждения РНК.
9. Отцентрифугируйте раствор 10 мин на микроцентрифуге для осаждения РНК.
10. Растворите РНК в 1,0 мл 0,1×MOPS и затем отдиализуйте этот раствор в течение 2 ч против 0,1×MOPS. Выход РНК должен составлять ~1 мг РНК на $1 \cdot 10^8$ клеток[2].

[1] Вся используемая стеклянная или пластиковая посуда должна быть обработана 0,05%-ным раствором диэтилпирокарбоната в воде с последующим прогреванием при 120 °С в течение 2 ч для удаления следов РНКазы. Все растворы, в которых будет находиться РНК, должны быть по возможности проавтоклавированы перед использованием. Чтобы предотвратить загрязнение препаратов РНКазой (см. гл. 8), экспериментатор должен работать в пластиковых перчатках одноразового использования.

[2] РНК можно хранить длительное время при —20 °С в осажденном виде в этаноле или в высушенном состоянии после лиофилизации.

HSV [10, 43]. В табл. 13 описано выделение суммарной клеточной РНК, а в табл. 14 — тест на наличие *tk*-мРНК методом гибридизации.

Таблица 14. Спот-гибридизационный тест на наличие тимидинкиназной мРНК [43]

1. Приготовьте следующие растворы:
   Буфер для предгибридизации
   50%-ный раствор деионизованного формамида[1]
   5×SSC[2]
   5×раствор Денхардта[3]
   Денатурированная ДНК спермы лосося в концентрации 250 мкг/мл[4]
   50 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 6,5
   Буфер для гибридизации
   50%-ный раствор формамида в деионизованной воде
   5×SSC
   1×раствор Денхардта
   Денатурированная ДНК спермы лосося в концентрации 100 мкг/мл
   10%-ный раствор декстрансульфата натрия 500 (Sigma)
   20 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 6,5
2. Растворите суммарную клеточную РНК, выделенную так, как это описано в табл. 13, в дистиллированной воде до концентрации 4 мг/мл.
3. Предварительно обработайте нитроцеллюлозный фильтр (10×10 см), смачивая его водой и затем ополаскивая в 20×SSC в течение нескольких минут или выдерживая его в этом растворе до тех пор, пока он не понадобится. Промокните фильтр, высушите на воздухе и затем нанесите пробы РНК по 5 мкл на отмеченные участки фильтра.
4. Прогрейте фильтр при 80 °С 2—3 ч.
5. Перенесите фильтр в пластиковый пакет и добавьте 10 мл предгибридизационного буфера. По возможности удалите из пакета воздух и запаяйте его с помощью специального приспособления. Проинкубируйте пакет в водяной бане при 42 °С 3—5 ч.
6. Выньте пакет из водяной бани и вскройте его, отрезав один угол ножницами. Выдавите из пакета как можно больше предгибридизационного буфера.
7. Добавьте 5—10 мл гибридизационного буфера, содержащего денатурированную ДНК-зонд в концентрации 5—10 нг/мл, заранее помеченную in vitro с помощью ^{32}P методом ник-трансляции. Удалите из пакета воздух и вновь запаяйте отрезанный край. Проинкубируйте пакет в водяной бане при 42 °С 12—15 ч.
8. Выньте пакет из водяной бани и отрежьте его края с трех сторон. Надев пластиковые перчатки одноразового использования, достаньте фильтр и сразу же погрузите его в пластиковую ванночку с 250 мл 0,5%-ного ДСН в 2×SSC при комнатной температуре.
9. Осторожно потряхивайте ванночку при комнатной температуре в течение 15 мин.
10. Слейте жидкость и вновь промойте фильтр при комнатной температуре в свежем 0,5%-ном ДСН в 2×SSC, следуя пп. 8 и 9.
11. Добавьте 250 мл свежего 0,5%-ного ДСН в 2×SSC и проинкубируйте при 60 °С 30 мин на водяной бане со встряхиванием.
12. Замените раствор для промывания на 250 мл 0,5%-ного ДСН в 0,1×SSC и проинкубируйте при 60 °С 30 мин на водяной бане со встряхиванием.
13. Повторите п. 11.
14. Высушите фильтр на листе бумаги Whatman 3MM.
15. Перенесите фильтр в пластиковый мешочек и проведите радиоавтографию.

---

[1] Деионизуйте формамид путем встряхивания 5 г смешанной ионообменной смолы (например, Amberlite MB-3 или Dowex MR-3 фирмы Sigma) со 100 мл формамида в течение 30 мин при комнатной температуре в вытяжном шкафу. Профильтруйте формамид через хроматографическую бумагу Whatman 3MM и до использования храните при —20 °С.

[2] 1×SSC=0,15 М NaCl, 15 мМ цитрат натрия (трехзамещенный).
[3] Концентрированный 50-кратный раствор Денхардта готовят путем растворения 1 г фиколла (мол. масса 400 000), 1 г поливинилпирролидона и 1 г БСА (фракция V) в 100 мл H_2O.
[4] Чтобы приготовить денатурированную ДНК спермы лосося, растворите ДНК (фирмы Sigma, тип III, натриевая соль) в воде до концентрации 10 мг/мл. Раздробите ДНК, пропустив ее 10 раз через иглу для инъекций № 19. Прокипятите раствор ДНК 10 мин, быстро охладите и затем храните при —20 °С.

3.1.2. Гипоксантин-гуанин — фосфорибозилтрансфераза (HGPRT)

Гипоксантин-гуанин—фосфорибозилтрансфераза (HGPRT) — фермент, катализирующий дополнительные пути метаболизма аденина и гуанина. Можно получить HGPRT$^-$-клетки, а затем отобрать HGPRT$^+$-ревертанты и трансформанты на среде HAT точно таким же образом, как ТК$^+$-клетки ([40, 41]; табл. 1).

3.1.3. Аминогликозид — фосфотрансфераза (APH)

В одной из удобных доминантных селективных систем для клеток млекопитающих используется прокариотический ген аминогликозид-3′-фосфотрансферазы (*aph*). Транспозон Tn601 (903) содержит ген *aph*-I, а транспозон Tn5 — ген *aph*-II. Эти гены обусловливают устойчивость к аминогликозидным антибиотикам канамицину, неомицину и 3′-дезоксистрептамину (известному также как генетицин или G418), ингибирующим синтез белка у прокариот. APH инактивирует их путем фосфорилирования аминогликозидного остатка. Указанные антибиотики ингибируют также синтез белка в эукариотических клетках и, таким образом, позволяют создать доминантную селективную систему, для которой не требуются специальные мутанты.

Клетки млекопитающих не содержат эндогенных аминогликозид-фосфотрансфераз, но бактериальные ферменты могут синтезироваться в клетках млекопитающих, если к соответствующим генам присоединить регуляторные последовательности эукариотического происхождения [44]. Ген Tn5 *aph*-II был соединен с регуляторными последовательностями гена *tk* HSV; структура соответствующего гибридного гена показана на рис. 8, *А*. Ген *aph*-II был включен в векторы на основе вируса SV40 и использован для изучения экспрессии гена интерферона [45].

Генетицин (G418) можно использовать для отбора клеток, в которых происходит экспрессия бактериальных генов *aph*-I и *aph*-II; этот антибиотик имеется в продаже (Gibco). Клетки, в которых происходит экспрессия гена *aph*, можно отобрать на ростовой среде, в которую добавлен генстицин в концентрации 100—500 мкг/мл, убивающий нормальные APH$^-$-клетки. Клетки разных культур обладают неодинаковой чувствительностью к

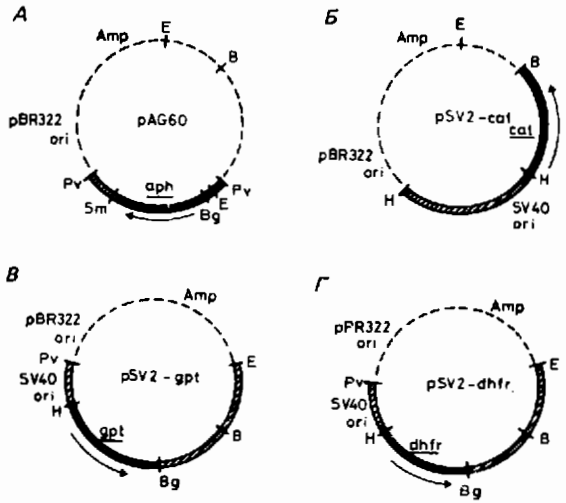


Рис. 8. Структура плазмидных векторов, содержащих биохимически селектируемые маркеры. *А*. Плазмида pAG60 содержит ген аминогликозид-3′-фосфотрансферазы (*aph*) [44]. *Б*. Плазмида pSV2-*cat* содержит ген хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (*cat*) [47]. *В*. Плазмида pSV2-*gpt* содержит ген ксантин-гуанин — фосфорибозилтрансферазы (*gpt*) [49]. *Г*. Плазмида pSV2-*dhfr* содержит ген дигидрофолатредуктазы [51]. Пунктирными линиями обозначены плазмидные последовательности; жирными полосками — последовательности *aph*, *cat*, *gpt* и *dhfr*, заштрихованными — регуляторные последовательности гена *tk* HSV-1 в pAG60, последовательности SV40 в pSV2-*cat*, в pSV2-*gpt* и в pSV2-*dhfr*; стрелками указано направление транскрипции. Карты изображены без соблюдения масштаба. E — *Eco*RI, B — *Bam*HI, Pv — *Pvu*II, Sm — *Sma*I, Bg — *Bgl*II, H — *Hind*III, ori — место начала репликации, Amp — ген β-лактамазы.

генетицину, поэтому наиболее подходящую концентрацию антибиотика нужно определять эмпирически (D. A. Spandidos, S. Campo, неопубликованные данные).

3.1.4. Хлорамфеникол-ацетилтрансфераза (CAT)

Транспозон Tn9 кодирует хлорамфеникол-ацетилтрансферазу (CAT) — фермент, который инактивирует хлорамфеникол, ацетилируя его. В эукариотических клетках этот фермент не синтезируется. Однако ген *cat* может быть экспрессирован при участии эукариотических промоторов, и существует чувствительный ферментативный тест на его наличие [46, 47]. Более того, были сконструированы рекомбинантные векторы SV40, несущие ген *cat* (рис. 8, *Б*), для оценки силы различных эукариотических промоторов [46, 47]. CAT-система была недавно использована также для изучения специфичности энхансерных после-

довательностей ДНК SV40 и вируса мышиной саркомы Молони по отношению к кругу хозяев [48]. При этом применялся анализ временной экспрессии.

3.1.5. Ксантин-гуанин — фосфорибозилтрансфераза [XGPRT]

Ген *gpt E. coli* кодирует фермент ксантин-гуанин—фосфорибозилтрансферазу (XGPRT) — бактериальный аналог фермента HGPRT млекопитающих. XGPRT с высокой эффективностью катализирует превращение ксантина в XMP — предшественник GMP, в то время как HGPRT утилизирует только гипоксантин и гуанин. Ген *gpt E. coli* был клонирован Муллиганом и Бергом [49] в векторе замещения поздних генов SV40 (рис. 8, *B*). Клетки обезьяны, инфицированные рекомбинантным вирусом, экспрессировали ген *gpt E. coli*. Продукт этого гена отличался от эндогенного фермента млекопитающих тем, что он был устойчив к ингибированию гипоксантином и имел другую электрофоретическую подвижность [49].

Способность гена *gpt E. coli* экспрессироваться в клетках млекопитающих позволила Муллигану и Бергу разработать систему положительной селекции [50]. Микофеноловая кислота является ингибитором IMP-дегидрогеназы, блокирующим превращение IMP в XMP и, следовательно, подавляющим синтез GMP de novo. Это ингибирование можно еще более усилить, если в среду добавить аминоптерин, который также блокирует синтез IMP. Клетки млекопитающих могут расти в присутствии этих двух ингибиторов, если в среду добавлены гуанин и гипо-

Таблица 15. Отбор *gpt*-трансформантов [50]

1. Посейте $\sim 1 \cdot 10^6$ реципиентных клеток на чашку Петри диаметром 10 см. Проинкубируйте при 37 °С 24 ч.
2. Проведите трансфекцию культур с помощью рекомбинантной плазмидной ДНК *E. coli*, несущей ген *gpt*, пользуясь кальций-фосфатной методикой (табл. 1, пп. 1—7).
3. Замените среду на свежую, предварительно подогретую среду и проинкубируйте при 37 °С в течение 3 сут для того, чтобы прошла предселективная экспрессия.
4. Трипсинизируйте клетки и посейте по $5 \cdot 10^5$ клеток на чашку Петри (диаметром 10 см) в среде Игла, содержащей диализованную сыворотку плода коровы в концентрации 10%, ксантин (250 мкг/мл), гипоксантин (15 мкг/мл), тимидин (10 мкг/мл), аминоптерин (2 мкг/мл), микофеноловую кислоту (25 мкг/мл) (Eli-Lilly Co.). Проинкубируйте клетки при 37 °С 24 ч.
5. Замените культуральную среду на свежую среду, содержащую такие же добавки, и обновляйте ее каждые 3 сут.
6. Через 2 нед можно будет выделить колонии с помощью специальных цилиндров для клонирования — так, как это описано в табл. 1, п. 11. Число *gpt*-трансформантов можно определить после фиксации в метаноле и окрашивания с помощью 10%-ного красителя Гимза (табл. 1, сноска 4).

ксантин или аденин; с помощью дополнительного метаболического пути фосфорибозилтрансферазы могут катализировать превращение этих оснований в соответствующие мононуклеотиды. Ингибирование не снимается, если в среду внесены аденин и ксантин, так как HGPRT млекопитающих не может превращать ксантин в XMP, и поэтому GMP не образуется. Однако, если в клетках млекопитающих происходит экспрессия *gpt*-гена *E. coli*, рост на среде с аденином и ксантином не подавляется. Как и в случае устойчивости к генетицину (разд. 3.1.3), *gpt*-селекцию можно проводить на клетках любого типа. Для немутантных клеток процедура такого отбора описана в табл. 15. Однако, когда в качестве реципиентов используются HGPRT$^-$-клетки (разд. 3.1.2), для выделения *gpt*-трансформантов достаточно провести HAT-отбор (табл. 1).

3.1.6. Дигидрофолатредуктаза (DHFR)

В качестве селектируемого маркера можно использовать также ген *dhfr* мыши, имея в виду, что клеточная дигидрофолатредуктаза ингибируется метотрексатом. Введение в клетку модифицированного *dhfr*-гена или увеличенного числа копий нормального гена приводит к повышению устойчивости к метотрексату. *dhfr*-кДНК мыши была клонирована в векторе замещения поздних генов SV40, а также в плазмидных векторах серии pSV [51] (рис. 8, *Г*). Трансфекция клеток яичника китайского хомячка (CHO) этими рекомбинантами и отбор DHFR$^+$-клеток по их способности расти на среде с метотрексатом описаны в табл. 16.

Таблица 16. Селекция *dhfr*-трансформантов [51]

1. Посейте по $\sim 1 \cdot 10^6$ DHFR$^-$-клеток CHO на чашку Петри (диаметром 10 см) за 12—18 ч до трансфекции.
2. Проведите трансфекцию клеток рекомбинантной плазмидой, содержащей ген *dhfr*, пользуясь кальций-фосфатной методикой (табл. 1, п.п. 1—7) с периодом абсорбции 8 ч.
3. Проинкубируйте клетки в неселективной среде Хэма F12 при 37 °C 3 сут, чтобы прошла предселективная экспрессия.
4. Трипсинизируйте клетки и рассейте половину содержимого каждой чашки со сплошным монослоем на селективную среду Хэма F12, содержащую 0,2 мкг/мл метотрексата, на 5 новых чашек (диаметром 10 см). Проинкубируйте чашки при 37 °C 24 ч.
5. Замените среду на свежую селективную среду, содержащую такие же добавки, и обновляйте ее каждые 3 сут.
6. Через 2 нед[1] можно будет выделить индивидуальные колонии с помощью специальных цилиндров для клонирования (табл. 1, п. 11).

[1] На этом этапе при необходимости можно вести непрерывный подсчет клеток путем их окрашивания и фиксации в некоторых из чашек, как это описано в табл. 1, сноска 4.

Использование в качестве селективного маркера гена *dhfr* имеет то преимущество, что трансформированные клетки продуцируют очень большое количество DHFR дикого типа, поскольку происходит амплификация генов [51], а амплифицируемый участок хромосомной ДНК весьма велик, в него входят протяженные последовательности, фланкирующие ген *dhfr* [52]. Кауфман и Шарп [53] сконструировали гибридные гены *dhfr*, соединенные с геном SV40; получившиеся рекомбинанты перенесли в $DHFR^-$-клетки CHO, а затем провели селекцию по способности к росту в присутствии метотрексата. В этих условиях были получены линии, в которых более 10% суммарного растворимого белка было представлено полипептидом, родственным малому *t*-антигену SV40. Когда в качестве донорной ДНК использовался мутантный доминантный ген *dhfr*, необходимость в $DHFR^-$-реципиентных клетках отпадала, поскольку по этому гену можно было проводить прямой отбор [32]. Был также клонирован прокариотический ген DHFR, использованный для индукции устойчивости к метотрексату в клетках мыши [54].

3.2. Доминантные трансформирующие гены, изменяющие регуляцию роста

Перенос генов с помощью ДНК стал одним из важнейших методов идентификации и анализа ряда вирусных и клеточных генов, изменяющих рост и морфологию клеток. В принципе трансформацию этими генами можно выявить в исследованиях двух типов, основанных на «спасении» культуры от старения или на выявлении маркеров «второй стадии» трансформации.

3.2.1. «Спасение» культуры от старения

Это исследование основано на том, что большинство первичных культур клеток млекопитающих перестают делиться, т. е. «стареют», пройдя определенное число пассажей. В некоторых случаях «старение» таких клеток можно предотвратить, подвергнув их различным воздействиям, например, с помощью вирусов или вирусных генов [55, 56]. Получить такую трансформацию клеток с помощью хромосомной ДНК пока не удалось, хотя ранее высказывалось предположение [57], что это возможно, если использовать целые хромосомы.

3.2.2. Маркеры «второй стадии» трансформации

Этим способом можно выявить среди реципиентных клеток такие, у которых изменен фенотип: морфология, способность к росту на полужидком агаре и индукция опухолей у животных [58—62]. Используемые в таких экспериментах реципиентные

Таблица 17. Перенос с помощью ДНК клеточных онкогенов в клетки NIH3T3

1. Посейте $1{,}5 \cdot 10^5$ клеток NIH3T3 во флакон (площадь роста 25 $см^2$) с 10 мл среды Хэма SF12, содержащей сыворотку плода коровы «Hyclone» в концентрации 15%, и проинкубируйте при 37 °С.
2. Через 24 ч инкубации приготовьте копреципитат ДНК — фосфат кальция, используя донорную ДНК (см. табл. 1, пп. 4—6), и добавьте по 1 мл на флакон с клетками.
3. Через 24 ч инкубации клеток с ДНК замените среду на свежую.
4. Еще через 24 ч. поменяйте среду в соответствии с одной из следующих прописей:
   а. Среду с низким содержанием сыворотки (среда Хэма SF12, содержащая 5% сыворотки «Hyclone») меняйте каждые 3—4 сут в течение 2—3 нед. Образование фокусов должно наблюдаться через 10 сут после трансфекции.
   б. Трипсинизируйте клетки и посейте их на среду Хэма SF12, содержащую сыворотку «Hyclone» (30%), с добавлением метоцеля (0,9%) и агара (0,6%). Колонии трансформированных клеток можно будет обнаружить через 7—10 сут после трансфекции.
   в. Трипсинизируйте клетки и инъецируйте по $1—2 \cdot 10^6$ клеток каждому из нескольких экспериментальных животных (например, «голым» мышам). Опухоли должны появиться в месте инъекции через 2—10 нед в зависимости от донорной ДНК.

клетки обычно представляют собой перевиваемые линии фибробластов грызунов, которые способны эффективно поглощать и экспрессировать экзогенную ДНК при трансфекции кальций-фосфатным методом. Это фибробласты NIH3T3, крысиные эмбриональные фибробласты Фишера, клетки CHO и C13-клон клеток BHK [58—62].

Недавно клетки NIH3T3 были использованы для идентификации и анализа активированных трансформирующих генов (онкогенов), присутствующих в разных опухолевых клетках [63—67]. Они с легкостью поддаются трансфекции, и вместе с тем у них часто наблюдается «вторая стадия» трансформации. Процедура анализа трансформирующих генов, присутствующих в суммарной ДНК опухолевых клеток, описана в табл. 17. Отметим, что популяции клеток NIH3T3 могут быть очень гетерогенны. Клоны, полученные в разных лабораториях, различаются по таким фенотипическим свойствам, как способность расти на определенной среде, потребность в сыворотке, способность к трансформации и уровень спонтанных трансформантов. Поэтому необходимо тщательно проверить все эти параметры, прежде чем использовать тот или иной клон.

4. Векторы на основе вирусов

Как говорилось в предыдущих разделах этой главы, наиболее распространенный метод введения последовательностей клонированной ДНК в реципиентные клетки млекопитающих — это

трансфекция с помощью изолированных рекомбинантных плазмид или фаговых ДНК; данный метод предполагает использование ДНК в качестве вектора. Альтернативный метод состоит в использовании вирусов эукариот; при этом клонированная ДНК вводится в клетку в результате обычной вирусной инфекции. Недавно было опубликовано несколько обзоров о применении таких векторов на основе вирусов [68, 69]. Имеются два типа вирусных векторов: литические вирусы типа вируса полиомы и SV40 и так называемые «челночные векторы» на основе ретровирусов и папилломавирусов. В последнем случае эукариотические клетки содержат кольцевые эписомные копии рекомбинантного вектора, и эти копии могут быть экстрагированы и использованы непосредственно для трансформации бактерий.

4.1. Векторные системы на основе литических вирусов

Наличие многочисленных данных по структуре и функциям SV40 [55] позволяет широко использовать этот вирус в качестве источника генетического материала, т. е. источника промоторов и энхансеров как для векторов на основе ДНК, так и для вирусных векторов. При условии что имеются соответствующие хелперные вирусы, рекомбинантные геномы SV40 можно упаковать в инфекционные вирусные частицы. После инфицирования клеток-хозяев рекомбинантными SV40 образующиеся гибридные мРНК подвергаются обычному процессингу и транслируются [70, 71]. Важное усовершенствование векторов SV40 было связано с получением линий клеток COS [72]. Эти клетки несут интегрированные геномы SV40, дефектные по сигналам начала репликации (*ori*), и векторные вирусы SV40, дефектные по ранним генам, могут размножаться в них без помощи хелперного вируса [73]. Однако активно реплицирующийся SV40 является цитотоксичным и, кроме того, включает фрагменты чужеродной ДНК только ограниченных размеров (до 2,5 kb). Позднее были исследованы другие векторные системы, основанные на литических вирусах: аденовирусах [74, 75], вирусах герпеса [76] и вирусах осповакцины [77], которые способны включать фрагменты чужеродной ДНК гораздо большего размера.

4.2. Векторные системы на основе ретровирусов

Большинство эукариотических векторных систем, в которых для амплификации рекомбинантного генома используются вирусные частицы, основаны на применении литических вирусов

(разд. 4.1), обладающих очень серьезным недостатком — они убивают клетки. В идеале хотелось бы получить стабильную клеточную линию, способную постоянно реплицировать и экспрессировать донорную ДНК. Многими ценными с точки зрения использования в качестве векторов свойствами обладают ретровирусы. Они реплицируются с образованием промежуточной формы — кольцевой провирусной ДНК, которая эффективно интегрируется в хромосому клетки-хозяина по механизму, свойственному транспозонам, и не обязательно являются цитотоксичными. Разработкой векторов на основе ретровирусов активно занимаются несколько лабораторий, и уже сообщалось об успешном размножении рекомбинантных ретровирусов, содержащих *tk*-ген HSV (разд. 3.1.1) или *gpt*-ген *E. coli* (разд. 3.1.5) [78—81]. В такие векторы могли бы быть введены сигналы начала репликации и селектируемые маркеры для прокариотических клеток, что позволило бы перенести их прямо в бактериальные клетки. Сейчас имеются мутантные по упаковке ретровирусы, которые можно использовать для получения рекомбинантных вирусов, не нуждающихся в хелперах [81, 82]. Интересную перспективу открывает использование ретровирусных векторов для введения генов в клетки зародышевого пути животных [83].

4.3. Векторы на основе папилломавирусов

Другой подход к получению стабильной клеточной линии, предназначенной для постоянной репликации и экспрессии донорной ДНК, не связан с использованием ретровирусов. Он основан на разработке систем, в которых донорная ДНК реплицируется как эписома. Эписомные системы имеют еще одно

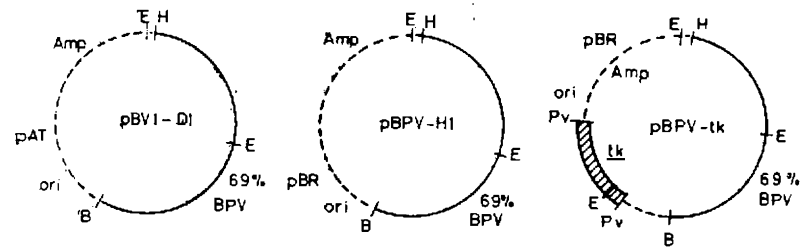


Рис. 9. Векторы на основе вируса папилломы. Конструирование pBVI-DI описано в работе [89], pBPV-HI — в работе [91] pBPV-*tk* — в работе [92]. Пунктирные линии обозначают плазмидные последовательности, сплошные — последовательности BPV; заштрихованные полоски — последовательности *tk*-гена HSV. Карты даны без соблюдения масштаба. E — *Eco*RI, *B* — *Bam*HI, H — *Hind*III, Pv — *Pvu*II, ori — место начала репликации pAT153, pBR — последовательности плазмиды pBR322, Amp — ген β-лактамазы, pAT — последовательности плазмиды pAT153.

Таблица 18. Использование челночных векторов на основе BPV

После трансформации клеток млекопитающих челночным вектором на основе BPV последовательности, содержащие ДНК BPV, обнаруживаются в ядре в виде множественных эписомных копий. Эту ДНК можно выделить из супернатанта методом Хирта [93] и затем прямо использовать для трансформации бактериальных клеток.

Трансформация клеток млекопитающих

1. Проведите трансфекцию мышиных клеток NIH3T3 или C127 рекомбинантными плазмидами, содержащими трансформирующие гены ДНК BPV-1 (см. рис. 9), с помощью кальций-фосфатного метода (табл. 1).
2. Выделите трансформированные колонии и снимите их, пользуясь цилиндрами для клонирования (табл. 1). Перенесите трипсинизированные клетки во флаконы (площадь роста 25 см^2), содержащие по 5 мл среды Хэма SF12, в которой присутствует сыворотка «Hyclone» в концентрации 5%.
3. Выращивайте клетки на этой среде, пока их количество не станет достаточным для выделения ДНК. Для получения большого количества клеточной массы лучше использовать флаконы большего размера (площадь роста 75 см^2).

Выделение ДНК из супернатанта по методу Хирта [93]

1. Слейте ростовую среду и промойте клетки дважды раствором 0,15М NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 7,4, стараясь не повредить клеточный монослой.
2. Осторожно добавьте 20 мл 0,6%-ного ДСН, 10 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl, pH 7,5, на один флакон (с площадью роста 75 см^2), содержащий $1—2 \cdot 10^7$ клеток, так чтобы среда распределилась равномерно. Проинкубируйте 20 мин при комнатной температуре, в покое.
3. Аккуратно слейте раствор в стеклянную пробирку Corex (Du Pont). При необходимости пользуйтесь резиновой палочкой.
4. Заклейте пробирку парафильмом и перемешайте содержимое, 10 раз осторожно перевернув пробирку. Проинкубируйте пробирку в течение ночи, а еще лучше 72 ч, при 4 °С.
5. Отцентрифугируйте содержимое пробирки при 15 000g 30 мин. Отберите супернатант и еще раз отцентрифугируйте остаток для получения дополнительного количества супернатанта, если в этом есть необходимость.
6. Проведите экстракцию обеих порций супернатанта фенолом, насыщенным 10 мМ NaCl, 10 мМ ЭДТА, 50 мМ трис-HCl, pH 8,0.
7. Отделите водный слой центрифугированием и вновь проведите экстракцию равным объемом смеси хлороформ — изоамиловый спирт (24 : 1 по объему).
8. Отделите водный слой центрифугированием. Осадите ДНК добавлением 2,5 объемов этанола и оставьте на ночь при —20 °С.
9. Соберите ДНК центрифугированием при 12 000g 10 мин.
10. Растворите осадок ДНК в 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0 (1 мл на исходное количество клеток с площади роста 75 см^2) и отдиализуйте против этого буфера.

Выход ДНК в этом методе составляет примерно 10 мкг, и лишь небольшая часть ее представляет собой ДНК BPV.

Трансформация бактерий плазмидной ДНК [94, 95]

1. Приготовьте следующие растворы и среды:

L-бульон (табл. 4)

Буфер для трансформации

0,10 М $CaCl_2$
0,25 М KCl
5 мМ $MgCl_2$
10 мМ RbCl
5 мМ трис-HCl, pH 7,6

Простерилизуйте раствор фильтрованием

Буфер для хранения

0,10 М $CaCl_2$
0,25 М KCl
5 мМ $MgCl_2$
10 мМ RbCl
5 мМ трис-HCl, pH 7,6
15%-ный глицерол

Простерилизуйте этот раствор фильтрованием

Чашки с агаром

Приготовьте бактериологический агар:

5,0 г NaCl
5,0 г триптона (Difco)
2,5 г дрожжевого экстракта (Difco)
6,0 г бакто-агара (Difco)
Дистиллированная вода до 500 мл

Проавтоклавируйте агар и дайте ему остыть до 50 °С. Затем добавьте необходимые антибиотики. Выбор антибиотика зависит от селектируемого бактериального гена, присутствующего в плазмидной ДНК; для гена β-лактамазы следует добавлять ампициллин до конечной концентрации 100 мкг/мл. Хорошо перемешайте агар и разлейте его по 20 мл на чашку Петри (10 см диаметром).

2. Посейте 1 мл ночной бактериальной культуры в 200 мл L-бульона во флаконе на 1 л. Выращивайте клетки со встряхиванием, пока A_{650} не достигнет 0,6.
3. Соберите бактерии центрифугированием при 5 000 *g* 10 мин при 4 °С.
4. Осторожно ресуспендируйте клетки в 100 мл буфера для трансформации. Оставьте во льду на 20 мин.
5. Соберите клетки центрифугированием, как в п. 3.
6. Осторожно ресуспендируйте клетки в 20 мл буфера для хранения. Отберите по 1 мл бактериальной суспензии в стерильные пробирки и храните при —70 °С.
7. Разведите плазмидную ДНК (в количестве до 40 нг), которой будет проводиться трансформация, в буфере для трансформации до конечного объема 0,2 мл. Добавьте 0,2 мл свежеприготовленных или размороженных бактерий (см. п. 6) и оставьте на льду на 25 мин.
8. Перенесите в водяную баню, нагретую до 37 °С. Проинкубируйте 5 мин при этой температуре.
9. Добавьте 1 мл L-бульона в каждую пробирку и проинкубируйте при 37 °С в течение 1 ч без встряхивания. За это время у бактерий должна восстановиться жизнеспособность и начать экспрессироваться устойчивость к антибиотикам.
10. Рассейте по 0,2 мл клеток на приготовленные чашки с бактериологическим агаром. Подержите чашки при комнатной температуре 10—15 мин, чтобы впиталась влага.
11. Переверните чашки и проинкубируйте их при 37 °С. Колонии должны появиться через 12—15 ч. По этой прописи можно получить $5 \cdot 10^5$—$5 \cdot 10^6$ трансформантов *E. coli* HB101[1] на 1 мкг интактной ДНК pBR322.

[1] Компетентные клетки HB101 можно хранить при —70 °С без заметного снижения эффективности трансформации. При использовании других бактериальных штаммов может потребоваться использовать на стадии 7 свежеприготовленные клетки.

преимущество: при их использовании снимаются проблемы, связанные с упаковкой. Папилломавирусы отличаются от других паповавирусов тем, что трансформированные ими клетки содержат не интегрированную вирусную ДНК [84—86], а 50—

300 копий кольцевой вирусной ДНК в свободном виде. В качестве примера рассмотрим вирус папилломы быка (BPV). Рекомбинантные плазмиды, содержащие трансформирующую область ДНК BPV, могут эффективно индуцировать морфологическую трансформацию мышиных клеток C127 или фибробластов NIH3T3. Для трансформации необходимо только 69% генома BPV-1. Трансформированные клетки несут рекомбинантные геномы в виде эписом, и в них осуществляется правильная экспрессия эукариотических генов, встроенных в рекомбинантную плазмиду, например гена γ-интерферона человека [90] или гена β-глобина человека [91]. Более того, показано [91, 92], что BPV-рекомбинантные плазмиды можно выделить из фракции низкомолекулярных ДНК супернатанта, полученного по методике Хирта [93], для последующей трансформации *E. coli*. Таким образом, BPV-векторы в сочетании с подходящими клетками-хозяевами образуют прекрасную систему челночных векторов для клеток млекопитающих. Структура некоторых челночных векторов на основе BPV показана на рис. 9, а их использование описано в табл. 18. Следует отметить, что эта система применима главным образом к клеткам млекопитающих, склонным к морфологической трансформации, индуцируемой BPV, например к клеткам NIH3T3 или C127.

5. Экспрессия перенесенных генов

Механизмы включения донорной ДНК в реципиентные клетки и последующей экспрессии этой ДНК недостаточно ясны. Вскоре после введения ДНК начинается фаза временной генной экспрессии. Вероятно, во время этой фазы нововведенные гены превращаются в мини-хромосомы [96]. При селективных условиях трансформированные колонии появляются через 1—3 нед с частотой, отражающей, по-видимому, начальный уровень генной экспрессии во временной фазе.

5.1. Временная экспрессия

Когда для переноса генов используется кальций-фосфатная методика (разд. 2.1), длительность фазы временной экспрессии составляет 2—3 сут. Кинетические кривые экспрессии, полученные путем измерения тимидинкиназной активности (табл. 12) и с помощью спот-гибридизационного теста на ТК-мРНК (работа [43] и табл. 14) в случае клеток ВНКТК$^-$ и LATK$^-$, приведены на рис. 10. Видно, что максимум экспрессии гена *tk* в клетках ВНК и LA достигается соответственно через 24 ч и 48 ч после трансфекции.

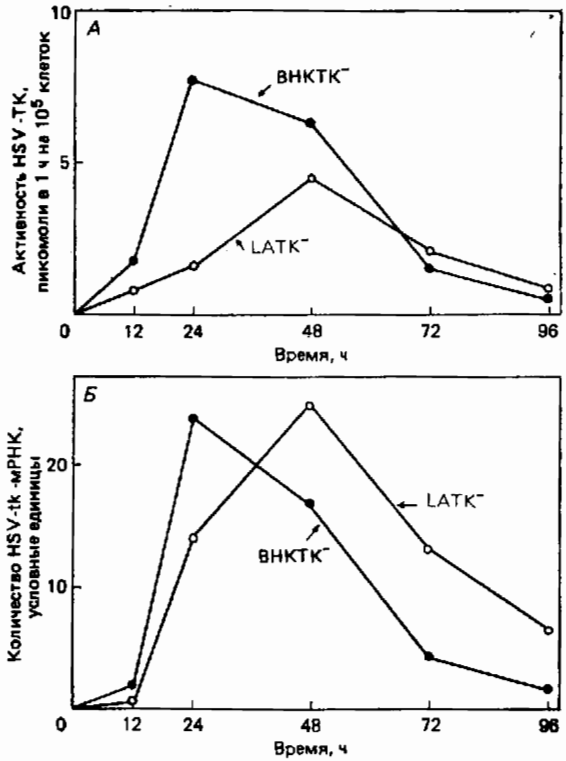


Рис. 10. Временная экспрессия *tk*-гена HSV в клетках мыши и хомячка. *А*. Активность HSV-тимидинкиназы в лизатах клеток LATK⁻ или ВНКТК⁻, которые были трансфицированы рекомбинантной плазмидой, несущей *tk*-ген HSV. Использовалась плазмида pTKMOLTR1 (см. рис. 12), а трансфекцию клеток проводили методом, описанным в табл. 1. Копреципитат ДНК—фосфат кальция удаляли из клеток через 6 ч после начала инкубации и заменяли среду на свежую неселективную. Через определенные интервалы времени клетки центрифугировали, ресуспендировали до концентрации $2 \cdot 10^7$ клетка/мл в 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 5 мМ β-меркаптоэтаноле и 5 мкМ дезокситимидине и обрабатывали ультразвуком. Лизаты хранили при —70 °С до момента определения активности HSV-TK методом, описанным в табл. 12. *Б*. Содержание HSV-*tk*-мРНК в клетках LATK⁻ и ВНКТК⁻, трансфицированных рекомбинантной плазмидой pTKMOLTR1. Из клеток, полученных так, как это описано выше, отбирали пробы для выделения РНК (см. табл. 13). С помощью спор-гибридизации проводили анализ этой РНК на присутствие HSV-*tk*-мРНК (см. [43] и табл. 14). По 20 мкг каждой РНК наносили на нитроцеллюлозные фильтры (делали по две параллели) и проводили гибридизацию с *Bgl*II-*Ssi*I *tk*-специфичным фрагментом ДНК длиной 0,6 *kb*, меченным ^{32}P методом ник-трансляции. С фильтров были получены радиоавтографы и проведен их количественный денситометрический анализ. Среднее по двум параллельным дотам для каждой точки выражено в условных единицах.

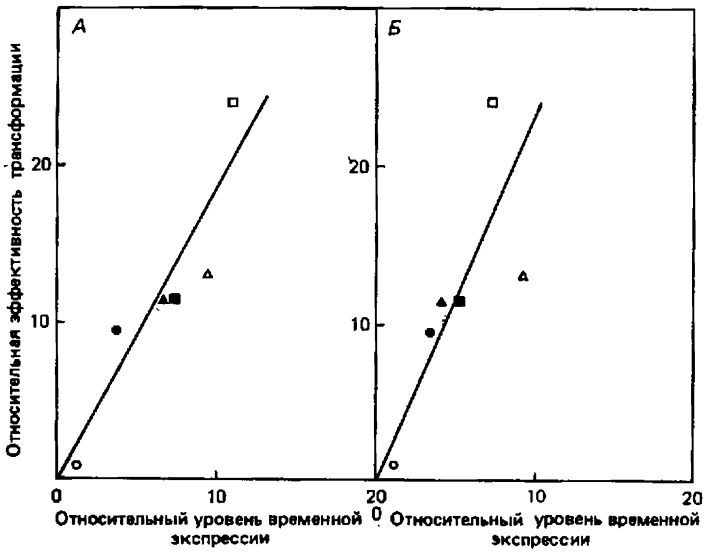


Рис. 11. Корреляция между временной экспрессией и эффективностью трансформации рекомбинантными плазмидами, содержащими последовательности — регуляторы транскрипции из различных эукариотических генов. *А*. Зависимость временного уровня *tk*-мРНК от эффективности трансформации. *Б*. Зависимость временного уровня ТК от эффективности трансформации. Плазмиды pTKεl(○), pTKl(●), pTKεSV1(△), pTKεSV2(▲), pTKεMOE1(□) и pTKεMOE2(■) несут *tk*-ген HSV, находящийся под контролем различных последовательностей — регуляторов транскрипции, в том числе энхансера SV40 (pTKεSV1 и pTKεSV2) и энхансера MoMuSV (pTKεMOE1 и pTKεMOE2). Полученные результаты отнесены к соответствующим величинам для стандартной плазмиды pTKεl, не несущей энхансерных последовательностей (рис. 12). Все эти данные получены по результатам работы [98].

Имеющиеся данные позволяют думать, что считывание *tk*-гена правильно инициируется и терминируется, а транскрипты подвергаются процессингу [90, 91, 97]. Так, из рис. 11 видно, что существует четкая корреляция между относительным содержанием образующейся *tk*-мРНК и количеством синтезируемой тимидинкиназы. Аналогичные результаты были получены для гена *cat* в опытах по временной экспрессии (см. работы [46—48] и разд. 3.1.4).

5.2. Стабильная трансформация

При селективных условиях колонии трансформированных клеток появляются через 1—3 нед после трансфекции кальций-фосфатным методом. В случае трансфекции *tk*-геном HSV $ТК^+$-трансформированные колонии можно подсчитывать и от-

бирать через 7 сут, если в качестве реципиентов используются клетки ВНК, и через 10—14 сут, если используются LATK⁻-клетки. Частота трансформации для нормального *tk*-гена HSV составляет 2000—4000 колоний на 1 мкг. Однако ген *tk* (см. разд. 5.3) можно поставить под контроль разных эукариотических сигналов регуляции транскрипции. Активность полученных таким образом разных гибридных генов существенно различается как в опытах по временной экспрессии, так и в опытах по стабильной трансформации [10, 98]; частота трансформации варьирует в пределах четырех порядков величины. Чувствительность теста на трансформацию на два порядка выше, чем у теста на временную экспрессию (разд. 5.1). На рис. 11 проводится прямое сравнение уровня временной экспрессии *tk*-гена и эффективности трансформации для ряда гибридных *tk*-генов [10, 98]. Видно, что имеет место четкая корреляция между уровнем временной экспрессии *tk*-гена и частотой последующей трансформации. Таким образом, начальный уровень экспрессии, возможно, играет главную роль в определении эффективности трансформации. Тем не менее, несмотря на эту корреляцию, в линиях стабильно трансформированных клеток на первых пассажах можно обнаружить лишь очень небольшие различия в количествах *tk*-ДНК, *tk*-мРНК и тимидинкиназы [98]. Это наводит на мысль о существовании дополнительной генетической регуляции, проявляющейся при росте клеток на селективной среде НАТ. Аналогичные исследования с другими селектируемыми генами пока не проводились.

Когда клетки растут в культуре, число копий и состояние донорной ДНК сложным образом меняется [2, 4]. Состояние донорной ДНК в стабильно трансформированных клетках в какой-то степени зависит от последовательности ДНК, регулирующей экспрессию *tk*-гена. Данные по трансфекции *tk*-геном, полученные в работе [99], позволяют предположить, что на какой-то стадии трансфекции происходит активная рекомбинация между проникшими в клетку молекулами ДНК, приводящая к образованию комплексов внехромосомной ДНК, в которых селектируемый ген связан с ДНК-носителем. При использовании гибридных *tk*-генов с низкой частотой трансформации стабильно трансформированные клетки обычно содержат 5—10 копий тандемно дуплицированной ДНК, по-видимому, без существенной перестройки последовательности [4, 98]. В большинстве случаев трудно определить, включается ли такая тандемная структура в хромосомы, но имеются некоторые данные о существовании внехромосомных копий *tk*-гена [2, 4, 100]. Напротив, когда используются такие регулирующие транскрипцию последовательности ДНК, которые дают высокую частоту трансформации, стабильно трансформированные культуры содержат

только 1—5 копий *tk*-гена, независимо включившихся в ДНК-носитель или в ДНК реципиентных клеток. В отдельных случаях наблюдалась ограниченная дупликация некоторых интегрированных копий, в том числе фланкирующих последовательностей ДНК-носителя или ДНК клетки-хозяина [101].

5.3. Изучение последовательностей, регулирующих транскрипцию

В принципе любой ген, для которого разработаны удобные количественные тесты, можно использовать для идентификации и анализа сигналов регуляции транскрипции в геномной ДНК. Вообще говоря, основной подход заключается в получении делеций и замещений в нормальной регуляторной последовательности или в добавлении к ней экзогенных регуляторных сигналов и последующем анализе изменений генной экспрессии с помощью метода генного переноса. Простой пример такого рода с использованием трансформации *tk*-геном представлен на рис. 12. Нормальный промотор *tk*-гена расположен между *Pvu*II- и *Bgl*II-сайтами плазмиды pTK1. Делеция промотора и его замещение одним *Hind*III-сайтом, в результате которого получается плазмида pTK10, приводят к уменьшению уровня генной экспрессии в 500 раз, а встраивание регуляторных последовательностей гена ε-глобина человека, дающее плазмиду pTKε1, или длинного концевого повтора (LTR) ДНК провируса мышиной саркомы Молони, приводящее к образованию плазмиды pTKMOLTR1, сопровождается реактивацией генной экспрессии. Таким образом, плазмиду pTK10 можно использовать в качестве вектора замещения для регуляторных последовательностей ДНК. Например, ее можно применять для анализа сигналов регуляции транскрипции в геноме папилломавируса [102]. Более высокий уровень генной экспрессии, наблюдающийся при использовании LTR-последовательности вируса мышиной саркомы Молони (MoMuSV) вместо нормального *tk*- или ε-глобинового промотора, обусловлен влиянием дополнительной регуляторной последовательности, которую называют энхансером или модулятором. Энхансеры — это короткие последовательности, которые стимулируют активность промоторов. Они действуют независимо от их ориентации в геномной ДНК и от расстояния между ними и промоторами [10, 98, 103, 104]. Большинство изученных к настоящему времени энхансеров ведут свое происхождение от эукариотических вирусов, но, вероятно, достаточно широко распространены и клеточные энхансерные последовательности. На рис. 13 изображены плазмиды, в которых энхансерные участки, взятые из нескольких эукариотических вирусов, находятся на расстоянии примерно 1 kb от

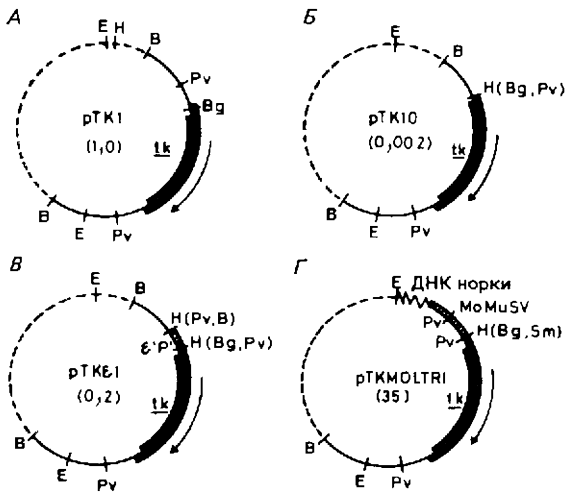


Рис. 12. Рекомбинантные плазмиды, несущие гибридные гены, которые содержат структурные последовательности *tk*-гена HSV-1, соединенные с гетерологичными эукариотическими промоторами. Трансформационная эффективность каждой плазмиды проверялась на LATK$^-$-клетках мыши методом, описанным в табл. 1. Эта эффективность, отнесенная к соответствующей величине для нормального гена в pTK1, указана в скобках для каждой рекомбинантной плазмиды. *А*. Рекомбинантная плазмида pTK1, содержащая *Bam*HI-фрагмент ДНК HSV-1 длиной 3,5 kb, который несет интактный ген *tk*. *Б*. Плазмида pTK10; промоторная область *tk*-гена делетирована. Этот *Pvu*II/*Bgl*II-фрагмент длиной 249 bp был удален, а сайты *Pvu*II и *Bgl*II заменены на сайт *Hind*III. *В*. Плазмида pTHKε1. *Bam*HI/*Pvu*II-фрагмент длиной 197 bp, содержащий промоторные последовательности гена ε-глобина человека, был встроен как *Hind*III-фрагмент в *Hind*III-сайт pTK10. *Г*. Плазмида pTKMOLTR1. *Eco*RI/*Hind*III-фрагмент, содержащий участок длиной 473 bp из MoMuSVLTR и 5′-фланкирующую последовательность ДНК норки, ставит транскрипцию *tk*-гена под контроль промотора, который в норме регулирует экспрессию вирусного гена MoMuSV. Пунктирные линии — последовательности плазмиды pAT153, сплошные — последовательности HSV. Наружные жирные полоски изображают последовательности структурного гена *tk*, внутренние — кодирующие последовательности *tk*; заштрихованные полоски — это последовательности человека и MoMuSV, несущие промоторные элементы; волнистая линия — последовательности ДНК норки. Стрелки указывают направление транскрипции. Карты нарисованы без соблюдения масштаба. E — *Eco*RI, B — *Bam*HI, H — *Hind*III, Pv — *Pvu*II, Bg — *Bgl*II, Sm — *Sma*I, ε′p′-промотор ε-глобина человека, MoMuSV — вирус мышиной саркомы Молони. Более подробное описание этих плазмид можно найти в работе [98].

нормального структурного *tk*-гена и расположены перед ним, если говорить о направлении транскрипции. Способность этих последовательностей усиливать транскрипцию *tk*-гена в фазе временной генной экспрессии (разд. 5.1) можно продемонстрировать с помощью норсерн-блот-гибридизации суммарной

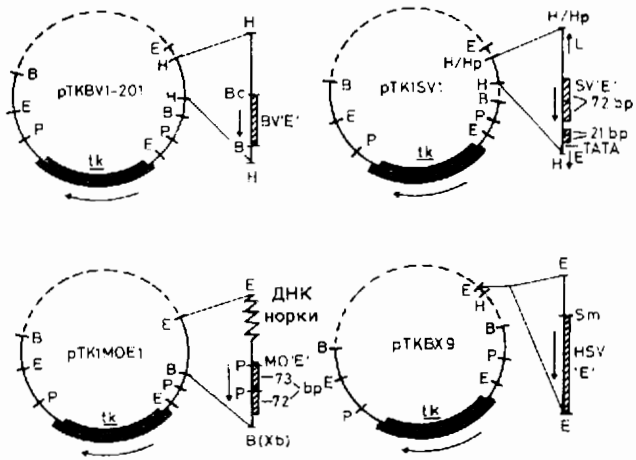


Рис. 13. Рекомбинантные плазмиды, несущие вирусные энхансерные последовательности. Плазмиды pTKBV1-201, pTK1SV1 и pTK1MOE1 несут энхансеры вируса бычьей папилломы (BPV-1), обезьяньего вируса 40(SV40) и вируса мышиной саркомы Молони (MoMuSV) соответственно. Они были описаны в работе [10]. Рекомбинантная плазмида pTKBX9 несет *Sma*I/*Eco*RI-фрагмент длиной 220 bp, содержащий энхансерную последовательность, локализованную на 100 bp левее сайта инициации транскрипции предранней мРНК HSV-1. Сайт *Sma*I был заменен сайтом *Eco*RI с помощью молекулярных линкеров. Пунктирные линии — последовательности плазмиды pAT153, сплошные — вирусные последовательности. Наружные жирные полоски — последовательности структурного гена *tk*, внутренние — кодирующие последовательности; заштрихованные полоски — вирусные последовательности, несущие энхансерные элементы; волнистая линия — последовательности ДНК норки; TATA — TATA-бокс (последовательности, гомологичные промотору). Стрелки указывают направление транскрипции. Энхансерные участки обозначены через 'E'. Таким образом, BV'E', SV'E', MO'E' и HSV'E' — это энхансеры BPV-1, SV40, MoMuSV и HSV-1 соответственно. Карты нарисованы без соблюдения масштаба. E — *Eco*RI, H — *Hind*III, P — *Pvu*II, Sm — *Sma*I, Bc — *Bcl*I, H/Hp — *Hind*III/*Hpa*II, B — *Bam*HI, B(xb) — *Bam*HI/*Xba*I.

клеточной РНК из трансфицированных клеток (рис. 14). Процедура выделения суммарной клеточной РНК из трансфицированных клеток для такого рода исследований описана в табл. 13. Метод норсерн-блоттинга рассматривается в гл. 2, разд. 5.2.2. Суть его состоит в том, что выделенные РНК фракционируют путем электрофореза в агарозном геле и затем переносят на мембранный нитроцеллюлозный фильтр. Изучаемые транскрипты выявляют методом гибридизации с соответствующим меченым ДНК-зондом с последующей радиоавтографией. Нормальный *tk*-транскрипт имеет размеры 1,3 kb, и при наличии энхансеров (плазмиды pTKBV1-201, pTK1SV1, pTK1MOE1, pTKBX9; см. рис. 13) РНК этого размера образуется в бо́льших количествах (в 5—20 раз больше, см. рис. 14), чем в их отсутствие

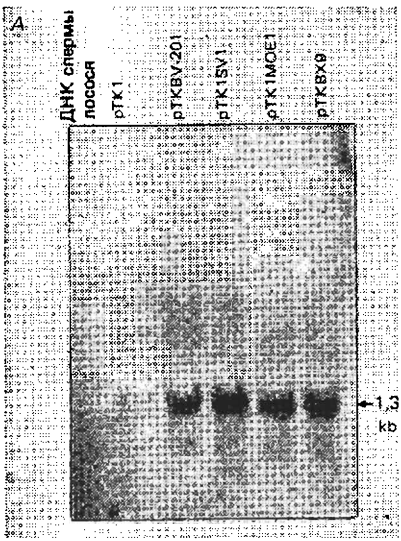


Рис. 14. Анализ *tk*-мРНК в трансфицированных клетках с помощью нозерн-блот-гибридизации. Из мышиных клеток LATK$^-$, трансфицированных ДНК указанных рекомбинантных плазмид, выделили суммарную клеточную РНК; пробы по 20 мкг фракционировали в 1%-ном агарозном геле с формальдегидом, переносили на нитроцеллюлозный фильтр и проводили гибридизацию с *Bgl*II/*Ssl*I *tk*-специфичным фрагментом кДНК длиной 0,6 kb, меченным ^{32}P [10]. *А*. Радиоавтограф. *Б*. Результат денситометрического сканирования полосы 1,3 kb (*tk*-мРНК). Структура плазмиды pTK1, содержащей ген *tk*, но не имеющей энхансерной последовательности, приведена на рис. 1, а структуры плазмид pTKBV1-201, pTK1SV1, pTK1MOE1 и pTKBX9, содержащих энхансеры BPV-1, SV40, MOMuSV и HSV-1 соответственно, — на рис. 13.

(плазмида pTK1; см. рис. 1). Во многих лабораториях использовали аналогичные методики для различных генных систем с целью анализа промоторов и энхансеров, но для исследования сигналов терминации транскрипции эти подходы пока не применялись.

5.4. Индуцибельные гены

Большой интерес представляет механизм активации генов. Известны гены, экспрессию которых можно индуцировать с помощью гормонов и ионов металлов или путем стимуляции клеток к дифференцировке, а также гены, активность которых регулируется белками, кодируемыми вирусной ДНК. Для изучения участков, ответственных за регуляцию транскрипции таких генов, применяются методы генного переноса. Ниже описан ряд таких систем, иллюстрирующих применение опытов по генному переносу на практике.

5.4.1. Металлотионеиновые гены

Металлотионеины — это вездесущие белки позвоночных. Они связывают тяжелые металлы и, как считается, участвуют в поддержании гомеостаза цинка и в обеспечении устойчивости к токсическому воздействию тяжелых металлов. Активность металлотионеинового гена 1 (*mt*-1) мыши регулируется на уровне транскрипции тяжелыми металлами и глюкокортикоидными гормонами, являющимися индукторами в этой системе. Поскольку ген *mt*-1 выполняет функцию «домоуправляющего», для его регуляции, по-видимому, не требуются тканеспецифические факторы, и, следовательно, эту регуляцию можно изучать в системах разного типа. Когда для трансформации HGPRT⁻-клеток Hc La использовали рекомбинантные векторы, содержащие *mt*-1-ген мыши и *gpt*-ген *E. coli*, то регуляция транскрипции *mt*-1 кадмием сохранялась, а регуляция глюкокортикоидами отсутствовала [105]. Чтобы выяснить, не связано ли это отсутствие реакции на глюкокортикоиды с неспособностью глюкокортикоидных рецепторов человека взаимодействовать с последовательностями ДНК мыши, клетки мыши LATK⁻ были трансформированы [105] вектором, содержащим интактный ген *mt*-1 и *tk*-ген HSV-1, или гибридным геном, в котором регуляторная часть промотора *mt*-1 была соединена с вирусным структурным геном тимидинкиназы (плазмида рМК1). И вновь оказалось, что транскрипция гена *mt*-1 регулируется кадмием, но не глюкокортикоидами. Более того, если клетки мыши были трансфицированы гибридным геном, наблюдалась регуляция кадмием тимидинкиназной активности. В опытах по делеционному картированию было показано, что последовательности ДНК, необходимые для регуляции кадмием мышиного гена *mt*-1, находятся на расстоянии не более 148 bp от места инициации транскрипции [105].

«Промоторные» области гена *mt*-1 были исследованы также с применением метода генного переноса путем микроинъекции. Когда в яйцеклетки мыши была инъецирована плазмида рМК и проведена инкубация с кадмием, тимидинкиназная активность увеличилась приблизительно в 10 раз по сравнению с контролем. Анализ набора делеционных мутантов показал, что последовательность, абсолютно необходимая для осуществления кадмиевой регуляции, находится на расстоянии не более 90 bp от места начала транскрипции [106]. Такая же гибридная плазмида рМК была введена путем микроинъекции в оплодотворенные яйцеклетки мыши с последующей пересадкой яиц другим самкам [107]. Десять из 69 мышей-потомков несли последовательности рМК, а у семи из них в печени наблюдалась высокая активность вирусной тимидинкиназы. Синтез этого фермента

индуцируется тяжелыми металлами, о чем свидетельствуют результаты исследования тимидинкиназной активности после частичной гепатэктомии при воздействии кадмием или без него. Однако глюкокортикоиды не оказывали на всех исследованных трансгенных мышей никакого влияния. Применимость этого метода введения генов в организм животных была изучена далее с использованием гибридного гена, полученного путем соединения металлотионеинового гена с геном гормона роста. Фрагмент ДНК, содержащий промотор *mt*-1 гена мыши, был соединен со структурным геном гормона роста крысы и микроинъецирован в пронуклеусы оплодотворенных яйцеклеток мыши [108]. Семь из 21 мыши, развившихся из этих яйцеклеток, несли гибридный ген, а шесть из этих семи животных были значительно крупнее своих собратьев.

5.4.2. Гены, активность которых изменяется под действием глюкокортикоидов

Считается, что в основе функционирования разных стероидных гормонов лежит один и тот же молекулярный механизм: гормон вначале связывается с тканеспецифичным цитоплазматическим рецепторным белком. Это взаимодействие приводит к такому изменению рецептора, при котором увеличивается его сродство к участкам связывания в ядре. В конце концов под действием стероидных гормонов изменяется картина синтезируемых клеткой белков, вероятно, путем изменения транскрипции нескольких специфических генов. Введение в клетки генов, активность которых изменяется под действием гормонов, позволяет создать экспериментальную систему для решения вопроса о том, является ли индуцибельность свойством, присущим определенным нуклеотидным последовательностям. Для этой цели был использован, например, вирус опухоли молочной железы мышей (MMTV) — ретровирус, отвечающий на стимуляцию глюкокортикоидами. Было показано, что клонированная ДНК интегрированного или неинтегрированного провируса, введенная в LATK$^-$-клетки мыши путем контрансформации с *tk*-геном HSV, транскрибируется с образованием нормальных вирусных РНК. Количество этих транскриптов увеличивается после обработки клеток дексаметазоном (синтетическим глюкокортикоидным гормоном) [109, 110]. При соединении с геном, кодирующим трансформирующий белок вируса мышиной саркомы Харви, или с геном дигидрофолатредуктазы мыши LTR-последовательность MMTV сообщает гибридному гену способность отвечать на индукцию дексаметазоном [111, 112]. Это дает основания полагать, что последовательности, ответственные за гормональную чувствительность MMTV, принадлежат вирусному LTR.

Аналогичные опыты проводились с целью анализа регуляторных последовательностей, необходимых для гормональной регуляции α_{2u}-глобулинового гена в клетках печени крысы [113] и гена гормона роста человека [114].

5.4.3. Глобиновые гены

Семейство глобиновых генов представляет собой великолепную модельную систему для изучения экспрессии тканеспецифичных генов и изменения этой экспрессии в процессе развития. И у человека, и у мыши ген главного β-глобина в норме экспрессируется только в дифференцированных эритроидных клетках; но когда в фибробласты мыши вводили кальций-фосфатным методом глобиновые гены, содержащие фрагмент ДНК длиной до 1 kb в направлении к 5′-концу от сайта кэпирования мРНК, они экспрессировались в этих клетках [115, 116]. Таким образом, при введении экзогенных глобиновых генов утрачивается некий элемент нормальной регуляции. Тем не менее в некоторых системах наблюдается индукция введенных глобиновых генов во время эритроидной дифференцировки [2]. Рассмотрим один такой пример. Эритролейкемические клетки Френд представляют собой перевиваемые клеточные линии, ведущие свое происхождение от мышиных опухолей, индуцированных вирусом Френд. Они являются предшественниками эритроидов,

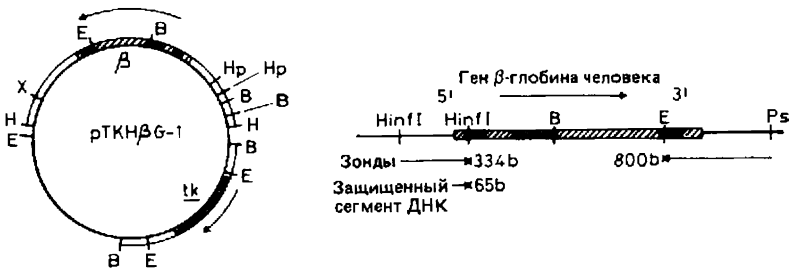


Рис. 15. *А*. Рекомбинантная плазмида pTKHβG-1, содержащая ген β-глобина человека и *tk*-ген HSV-1. Этот рекомбинант был описан в работе [2]. Экзоны обозначены жирными полосками, а интроны и нетранслируемые участки — заштрихованными. β — ген β-глобина человека. Стрелка указывает направление транскрипции. *Б*. Рестрикционная карта гена β-глобина человека (ее полярность противоположна полярности карты на рис. *А*). ДНК-зонд длиной 800 нуклеотидов использовалась для анализа методом нозерн-блот-гибридизации β-глобиновых РНК-транскриптов (рис. 16), а ДНК-зонд длиной 334 нуклеотида — для S1-нуклеазного картирования этих транскриптов (см. подпись к рис. 17). Указан также сегмент этой ДНК-зонда длиной 65 нуклеотидов, защищенный от нуклеазы β-глобиновым РНК-транскриптом человека (рис. 17). Карты нарисованы без соблюдения масштаба. E — *Eco*RI, H — *Hind*II, B — *Bam*HI, X — *Xba*I, Hp — *Hpa*I, Ps — *Pst*I.

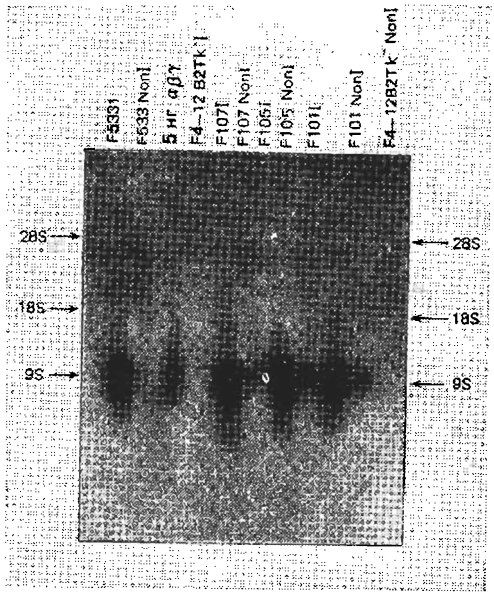


Рис. 16. Анализ методом нозерн-блот-гибридизации poly(A)+-РНК, выделенной из индуцированных и неиндуцированных клеток эритролейкемии Френд. Клетки F4-12B2TK⁻ были трансформированы рекомбинантной плазмидой pTKHβG-I, в результате чего получены клеточные линии F101, F105 и F107. Аналогичным образом трансформация плазмидой pTKHβGHp-3 привела к получению клеточной линии F533. Poly(A)+-РНК была выделена из 200 мкг суммарной РНК реципиентных (F4-12B2TK⁻) и трансформированных клеток (F101, F105, F107 и F533). Каждую линию инкубировали в течение 3 сут с ГМБА (3 мМ). Индуцированные препараты отмечены буквой I, неиндуцированные — NonI. РНК фракционировали в 1%-ном агарозном геле с формальдегидом и затем перенесли на нитроцеллюлозный фильтр. *Eco*RI/*Pst*I-фрагмент ДНК (800 нуклеотидов), содержащий 3′-область гена β-глобина человека и фланкирующий эту область участок (см. рис. 15, *Б*), был помечен in vitro ^{32}P методом ник-трансляции и использован в качестве гибридизационного зонда. Маркером для глобиновой 9S-РНК служила α,β,γ-глобиновая РНК (5 нг), выделенная из крови плода человека, взятой при заменном переливании. Представлен полученный радиоавтограф. Положения маркерных 28S- и 18S-рРНК были определены при окрашивании геля бромистым этидием.

и после обработки такими химическими индукторами, как ДМСО или гексаметилен-бис-ацетамид (ГМБА), дифференцируются в более зрелые клетки, в которых синтезируется большое количество глобина (главным образом глобина взрослого типа). Когда в ТК⁻-клетки Френд вводили ген β-глобина человека, соединенный с *tk*-геном HSV (рис. 15 и работа [2]), считывание гена β-глобина человека правильно инициировалось и терминировалось (D. A. Spandidos, J. Grindley, J. Paul, неопубли-

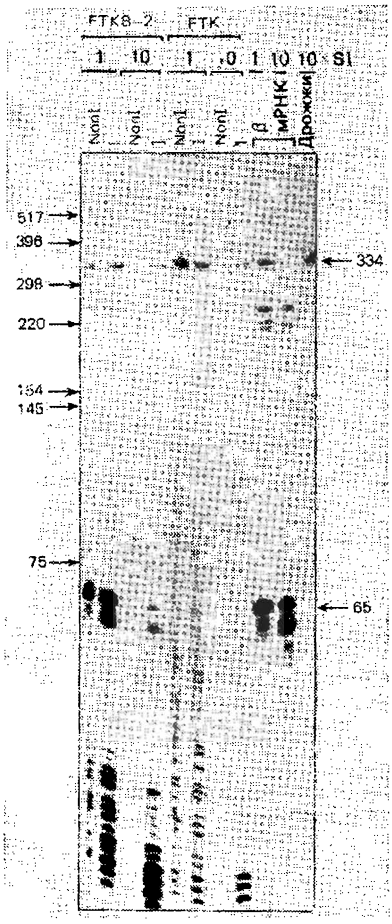


Рис. 17. Картирование 5′-конца β-глобиновой мРНК человека в мышиных эритролейкемических клетках с помощью нуклеазы S1. Одноцепочечный *Hin*fI-фрагмент (334 нуклеотида), соответствующий 5′-концу гена β-глобина человека (рис. 15, *Б*), был помечен ^{32}P по 5′-концу и проведена его гибридизация с суммарной РНК из нетрансформированных реципиентных клеток F4-12B2TK⁻ (FTK⁻) или из этих же клеток, трансформированных pTKHβG-1 (клетки FTKB-2). S1-нуклеазное картирование было проведено методом, описанным ранее (см. работу [117], а также гл. 2, разд. 5.2.2, и гл. 5, разд. 5.2). Использовались две разные концентрации нуклеазы S1 (1000 и 10 000 ед.); им соответствуют цифры 1 и 10 над дорожками на радиоавтографе. NonI — неиндуцированные клетки, I — индуцированные. В качестве позитивного и негативного контроля использовались β-глобиновая мРНК из крови плода человека, взятой при замещении переливании крови, и дрожжевая РНК соответственно. Размеры фрагментов ДНК, защищенных РНК от расщепления нуклеазой S1 (в парах нуклеотидов), указаны с правой стороны радиоавтографа, а размеры ДНК-маркеров (*Hin*fI-фрагменты плазмиды pBR322) — с левой.

кованные данные). Индукция под действием HMBA приводила к 20—50-кратному увеличению количества глобин-специфичной РНК (рис. 16). Далее был определен сайт инициации транскрипции генов глобиновых мРНК с помощью метода S1-нуклеазного картирования. Этот метод подробно описан в гл. 5, разд. 5.2. Он основан на гибридизации РНК-транскриптов с подходящей меченой ДНК-зондом, в данном случае с фрагментом ДНК длиной 344 нуклеотида, комплементарным 5′-концу β-глобинового гена человека и 5′-фланкирующим последовательностям (см. рис. 15, *Б*). Получившиеся гибриды инкубируют с нуклеазой-S1, которая расщепляет только одноцепочечную ДНК, но не ДНК в составе гибридных комплексов, и определяют размеры оставшихся фрагментов ДНК методом электрофореза

в геле. Если РНК-транскрипт имеет правильный 5′-конец, он должен защитить от расщепления сегмент ДНК-зонда длиной в 65 нуклеотидов (рис. 15, *В*); остальная часть молекулы ДНК останется в одноцепочечной форме и поэтому будет расщеплена. Как показано на рис. 17, длина сегмента ДНК, защищенного глобин-специфичными РНК-транскриптами, составляла 65 нуклеотидов, и, следовательно, эти транскрипты имели правильный 5′-конец и их синтез был правильно инициирован. Аналогичные результаты были получены в опытах с геном ε-глобина человека [2, 118, 119].

5.4.4. Другие индуцибельные гены

Сейчас известны и многие другие индуцибельные генные системы, для исследования которых применяются методы, аналогичные описанным выше. К ним относятся гены интерферонов (они индуцируются при вирусной инфекции или под действием poly (I), poly (C); [45, 120, 121]), гены белков теплового шока [122—124], иммуноглобулиновые гены [125] и гены антигенов тканевой совместимости [126, 127], а также вирусные гены, такие, как предранний ген HSV [128] и *tk*-ген HSV [129, 130].

Благодарности

Авторы благодарны Организации по изучению рака в Великобритании за поддержку, Джесуэ Лангу за плодотворное обсуждение и разрешение ссылаться на неопубликованные данные, Джоан Гриндлей за предоставление данных по S1-нуклеазному картированию и Эфраиму Кэму за предоставление рис. 6, *Б* и *В*.

Литература

1. *Graham F. L., van der Eb A. J.* Virology, 52, 456 (1973).
2. *Spandidos D. A., Paul J.* EMBO J., 1, 15 (1982).
3. *McKnight S. L.* Cell, 31, 355 (1982).
4. *Spandidos D. A., Harrison P. R., Paul J.* Exp. Cell Res., 141, 149 (1982).
5. *Birnboim H. C., Doly J.* Nucleic Acids Res., 7, 1513 (1979).
6. *Ishiura M., Hirose S., Uchida T., Hamada Y., Suzuki Y., Okada Y.* Mol. Cell. Biol., 2, 607 (1982).
7. *Gross-Bellard M., Oudet P., Chambon P.* Eur. J. Biochem., 36, 32 (1973).
8. *Yoder J. I., Ganesan A. T.* Mol. Cell Biol., 3, 956 (1983).
9. *Wigler M., Pellicer A., Silverstein S., Axel R.* Cell, 14, 725 (1978).
10. *Spandidos D. A., Wilkie N. M.* EMBO J., 2, 1193 (1983).
11. *Stow N. D., Wilkie N. M.* J. Gen. Virol., 33, 447 (1976).
12. *Fraley R., Subramani S., Berg P., Papahadjopoulos D.* J. Biol. Chem., 255, 10431 (1980).
13. *Farber F. E., Eberle B.* Exp. Cell Res., 103, 15 (1976).
14. *Wigler M., Sweet R., Sim G. K., Wold B., Pellicer A., Lacy E., Maniatis T., Silverstein S., Axel R.* Cell, 16, 777 (1979).

15. *Vaheri A., Pagano J. S.* Virology, **27**, 435 (1965).
16. *McCutchan J. H., Pagano J. S.* J. Natl. Cancer Inst., **41**, 351 (1965).
17. *Warden D., Thorne H. V.* J. Gen. Virol., **3**, 371 (1968).
18. *Pagano J. S.* Prog. Med. Virol., **12**, 1 (1970).
19. *Sompayrac L. M., Danna K. J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 7575 (1981).
20. *Chu G., Sharp P. A.* Gene, **13**, 197 (1981).
21. *Diacumakos E. G.* In: Methods in Cell Biology, vol. 7, Prescott D. M. (ed.), Academic Press, New York and London, p. 287, 1973.
22. *Graessmann M., Graessmann A.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 366 (1976).
23. *Stacey D. W., Alfrey V. G.* Cell, **9**, 725 (1976).
24. *Capecchi M.* Cell, **22**, 479 (1980).
25. *Yamamoto F., Furusawa M., Furusawa I., Obingta M.* Exp. Cell Res., **142**, 79 (1982).
26. *Wong T. K., Nicolau C., Hofschneider P. H.* Gene, **10**, 87 (1980).
27. *Schaefer—Ridder M., Wong Y., Hofschneider P. H.* Science (Wash.), **215**, 166 (1982).
28. *Szoka F., Jr., Papahadjopoulos D.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 4194 (1978).
29. *Straubinger R. M., Hong K., Friend D. S., Papahadjopoulos D.* Cell, **32**, 1069 (1983).
30. *Schaffner W.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 2163 (1980).
31. *Rassoulzadegan M., Binetruy B., Guzin F.* Nature, **295**, 257 (1982).
32. *Spandidos D. A., Siminovitch L.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 3480 (1977).
33. *Miller C. L., Ruddle F. H.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 3346 (1978).
34. *Mukherjee A. B., Orloff S., Butler J. D. B., Triche T., Lalley P., Schulman J. D.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 1361 (1978).
35. *Slilaty S. N., Aposhian H. V.* Science (Wash.), **220**, 725 (1983).
36. *Neumann E., Schaefer—Ridder M., Wang Y., Hofschneider P. H.* EMBO J., **1**, 841 (1982).
37. *Kit S., Dubbs D. R., Piekarski I. J., Hsu T. C.* Exp. Cell Res., **31**, 297 (1963).
38. *Bacchetti S., Graham F. L.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 1590 (1977).
39. *Topp W. C.* Virology, **113**, 408 (1981).
40. *Szybalska E., Szybalski W.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **42**, 2026 (1962).
41. *Littlefield J. W.* Science (Wash.), **145**, 709 (1964).
42. *Jamieson A. T., Subak-Sharpe J. H.* J. Gen. Virol., **24**, 481 (1974).
43. *Spandidos D. A., Harrison P. R., Paul J.* Biosci. Rep., **1**, 911 (1981).
44. *Colbere-Garapin F., Horodniceanu F., Kourilsky F., Garapin A. C.* J. Mol. Biol., **150**, 1 (1981).
45. *Canaani D., Berg P.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 5166 (1982).
46. *Gorman C. M., Moffat L. F., Howard B. H.* Mol. Cell Biol., **2**, 1044 (1982).
47. *Gorman C. M., Merlino G. T., Willingham M. C., Pastan I., Howard B. H.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 6777 (1982).
48. *Laimins L. A., Khoury G., Gorman C., Howard B., Gruss P.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 6453 (1982).
49. *Mulligan R. C., Berg P.* Science (Wash.), **209**, 1422 (1980).
50. *Mulligan R. C., Berg P.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 2072 (1981).
51. *Subramani S., Mulligan R., Berg P.* Mol. Cell Biol., **1**, 854 (1981).
52. *Shimke R. T., Brown P. C., Kaufman R. J., McGrogan M., Slate D. L.* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **45**, 785 (1981).
53. *Kaufman R. J., Sharp P. A.* J. Mol. Biol., **159**, 601 (1982).
54. *O'Hare K., Benoist C., Breathnach R.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 1527 (1981).
55. *Tooze J., ed.* DNA Tumor Viruses (2nd Edn.), published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1980.

56. *Weiss R. A., Teich N., Varmus H. E., Coffin J. M., eds.* RNA Tumor Viruses, Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1982.
57. *Spandidos D. A., Siminovitch L.* Nature, **271**, 259 (1978).
58. *Spandidos D. A., Siminovitch L.* Cell, **12**, 675 (1977).
59. *Shih C., Shilo B.-Z., Goldfarb M. P., Dannenberg A., Weinberg R. A.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 5714 (1979).
60. *Krontiris T. G., Cooper G. M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 1181 (1981).
61. *Smith B. L., Anisowicz A., Chodosh L. A., Sager R.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 1964 (1982).
62. *Padhy L. C., Shih C., Cowing D., Finkelstein R., Weinberg R. A.* Cell, **28**, 865 (1982).
63. *Goldfarb M., Shimizu K., Perucho M., Wigler M.* Nature, **296**, 404 (1982).
64. *Parada L. F., Tabin C. J., Shih C., Weinberg R. A.* Nature, **297**, 474 (1982).
65. *Santos E., Tronick S. R., Aaronson S. A., Pulciani S., Barbacid M.* Nature, **298**, 343 (1982).
66. *Hall A., Marshall C. J., Spurr N. K., Weiss R. A.* Nature, **303**, 396 (1983).
67. *Goubin G., Goldman D. S., Luse J., Neiman P. E., Cooper G. M.* Nature, 302, 114 (1983).
68. *Gluzman Y., ed.* Eukaryotic Viral Vectors, published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1982.
69. *Rigby P. W. J.* J. Gen. Virol., **64**, 255 (1983).
70. *Goff S. P., Berg P.* Cell, **9**, 695 (1976).
71. *Mulligán R. C., Howard B. H., Berg P.* Nature, 277, 105 (1979).
72. *Gluzman Y.* Cell, **23**, 175 (1981).
73. *Mellon P., Parker V., Gluzman Y., Maniatis T.* Cell, **27**, 279 (1981).
74. *Gluzman Y., Reichl H., Scolnick D.* In: Eukaryotic Viral Vectors, Gluzman Y. (ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. 187, 1982.
75. *Berkner K. L., Sharp P. A.* In: Eukaryotic Viral Vectors, Gluzman Y. (ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. 193, 1982.
76. *Spaete R. R., Frenkel N.* Cell, **30**, 295 (1982).
77. *Panicali D., Paoletti E.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 4927 (1982).
78. *Wei C. M., Gibson M., Spear P. G., Scolnick E. M.* J. Virol., **39**, 935 (1981).
79. *Shimotphno K., Temin H. M.* Cell, **26**, 67 (1981).
80. *Tabin C., Hoffman J., Goff S., Weinberg R.* Mol. Cell. Biol., **2**, 426 (1982).
81. *Mann R., Mulligan R. C., Baltimore D.* Cell, **33**, 153 (1983).
82. *Watanabe S., Semin H. M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 5986 (1982).
83. *Jaenisch R., Jahner D., Nobis P., Simon I., Lahler J., Harbers K., Grotkopp D.* Cell, **24**, 519 (1981).
84. *Law M. F., Lowy D. R., Dvoretzky I., Howley P. M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2727 (1981).
85. *Mour M. H., Campo M. S., Laird H. M., Jarrett W. F. H.* J. Virol., **39**, 945 (1981).
86. *Moar M. H., Campo M. S., Laird H. M., Jarrett W. F. H.* Nature, **293**, 749 (1981).
87. *Lowy D. R., Dvoretzky I., Shober R., Law M. F., Engel L., Howley P. M.* Nature, **287**, 72 (1980).
88. *Sarver N., Gruss P., Law M. F., Khoury G., Howley P. M.* Mol. Cell Biol., 1, 486 (1981).
89. *Campo M. S., Spandidos D. A.* J. Gen. Virol., **64**, 549 (1983).
90. *Zinn K., Mellon P., Ptashne M., Maniatis T.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 4897 (1982).
91. *Di Maio D., Treisman R., Maniatis T.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 4030 (1982).
92. *Sekiguchi T., Nishimoto T., Kai R., Sekiguchi M.* Gene, **21**, 267 (1983).
93. *Hirt B.* J. Mol. Biol., **26**, 365 (1967).

94. *Mandel M., Higa A.* J. Mol. Biol., 53, 154 (1970).
95. *Kishnec S. R.* In: Genetic Engineering, Boyer H. B. and Nicosia S. (eds.), Elsevier/North-Holland, Amsterdam, p. 17, 1978.
96. *Gilmour R. S., Gow J. W., Spandidos D. A.* Biosci. Rep., 2, 1031 (1982).
97. *McKnight S. L., Gavis E. R., Kingsbury R.* Cell, 25, 385 (1981).
98. *Lang J. C., Wilkie N. M., Spandidos D. A.* J. Gen. Virol., 64, 2697 (1983).
99. *Perucho M., Hanahan D., Wigler M.* Cell, 22, 309 (1980).
100. *Kretchmer P. J., Browman A. H., Huberman M. H., Souder—Haigh L., Killos L., Anderson W. F.* Nucleic Acids Res., 9, 6199 (1981).
101. *Rayes G. R., McLane N. W., Hayward G. S.* J. Gen. Virol., 60, 209 (1982).
102. *Campo M. S., Spandidos D. A., Lang J., Wilkie N. M.* Nature, 303, 77 (1983).
103. *Banerji J., Rusconi S., Schaffner W.* Cell, 27, 299 (1981).
104. *Moreau P., Hen R., Wasylyk B., Everett R., Gaub M. P., Chambon P.* Nucleic Asids Res., 9, 6047 (1981).
105. *Mayo K. E., Warren R., Palmiter D. R.* Cell, 29, 99 (1982).
106. *Brinster R. L., Chen H. Y., Warren R., Sarthy A., Palmiter R. D.* Nature, 296, 39 (1982).
107. *Palmiter R. D., Chess H. Y., Brinster R. L.* Cell, 29, 701 (1982).
108. *Palmiter R. D., Brinster R. L., Hammer R. E., Trumbauer M. E., Rosenfield M. G., Birnberg N. C., Evans R. M.* Nature, 300, 611 (1982).
109. *Buetti E., Diggelmann H.* Cell, 23, 335 (1981).
110. *Hynes N. E., Kennedy N., Rahmsdorf V., Groner B.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2038 (1981).
111. *Huang A. L., Ostrowski M. C., Berard D., Hager G. L.* Cell, 27, 245 (1981).
112. *Lee F., Mulligan R., Berg P., Ringold G.* Nature, 294, 228 (1981).
113. *Kurtz D. T.* Nature, 291, 629 (1981).
114. *Robins D. M., Pack I., Seeburg P. H., Axel R.* Cell, 29, 623 (1982).
115. *Mantei N., Boll W., Weissmann C.* Nature, 290, 26 (1979).
116. *Wold B., Wigler M., Lacy E., Maniatis T., Silverstein S., Axel R.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 5684 (1979).
117. *Alan M., Grindlay G. J., Stefani L., Paul J.* Nucleic Acids Res., 10, 5133 (1982).
118. *Paul J., Allan M., Grindlay J., Spandidos D.* In: Biochemistry of Differentiation and Morphogenesis, Jaenicke L. (ed.), 33 Coloquium Mosbach, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 142, 1982.
119. *Paul J., Spandidos D. A.* In: Stability and Switching in Cellular Differentiation. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 158, Clayton R. M. and Truman D. E. S. (eds.), Plenum Press, New York, p. 89, 1982.
120. *Mantei N., Weissmann C.* Nature, 297, 128 (1982).
121. *Hauser H., Gross G., Bruns W., Hochkeppel H.-K., Mayr V., Colins J.* Nature, 297, 650 (1982).
122. *Corces V., Pellicer A., Axel R., Meselson M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7038 (1981).
123. *Burke J. F., Ish—Horowicz D.* Nucleic Acids Res., 10, 3821 (1982).
124. *Pelham H. R. B.* Cell, 30, 517 (1982).
125. *Rice D., Baltimore D.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 7862 (1982).
126. *Mellor A. L., Golden L., Weiss E., Bullman H., Hurst J., Simpson E., James R. F. L., Townsend A. R. M., Taylor P. M., Schidt W., Ferluga J., Leben L., Santamaria M., Atfield G., Festernstein H., Flavell R. A.* Nature, 298, 529 (1982).
127. *Rabourdin—Combe C., March B.* Nature, 303, 670 (1983).
128. *Post L. E., Mackem S., Roizman B.* Cell, 24, 555 (1981).
129. *Wilkie N. M., Clements J. B., Boll W., Mantei N., Lonsdale D., Weissmann C.* Nucleic Acids Res., 7, 859 (1979).
130. *Zipser D., Lipsich L., Kwoh J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 6276 (1981).

ЭКСПРЕССИЯ ЭКЗОГЕННОЙ ДНК В ООЦИТАХ *XENOPUS*

А. Колмен

1. Введение

Ядро ооцита содержит достаточное количество трех эукариотических РНК-полимераз, чтобы удовлетворить потребности развивающегося эмбриона по крайней мере до стадии 30 000 клеток. Этот материнский запас может использоваться также для транскрипции экзогенной ДНК, инъецированной в ядро ооцита. Впервые это продемонстрировали Гердон и Мерц в 1977 г. [1][1]. В этих начальных экспериментах было показано только, что инъецированные ДНК действительно транскрибируются. Однако в ходе последующих опытов по инъекции ДНК, кодирующей 5S-рРНК, было установлено, что инициация и терминация транскрипции экзогенной ДНК осуществляются правильно [3]. Вслед за этим было проведено множество экспериментов по инъекции ДНК (см. обзоры [4—6]); некоторые из них перечислены в табл. 1. Их результаты можно суммировать следующим образом.

1. *Транскрипты, синтезируемые РНК-полимеразой III.* Вскоре после четкой демонстрации успешной транскрипции с помощью РНК-полимеразы III инъецированных генов 5S-рРНК были получены столь же четкие результаты с генами тРНК [16]. Более того, было показано, что сложные посттранскрипционные изменения (например, модификация оснований, процессинг и в некоторых случаях сплайсинг РНК), в норме осуществляющиеся при созревании этих первичных тРНК-транскриптов, происходят также и с продуктами транскрипции тРНК-генов, инъецированных в ооциты [17]. Было даже установлено, что может происходить правильный процессинг очищенных предшественников тРНК, инъецированных в ооциты [6].

2. *Транскрипты, синтезируемые РНК-полимеразой II.* Когда инъецируют белок-кодирующие гены, не имеющие интронов (например, гистоновые гены), часть актов транскрипции с помощью РНК-полимеразы II начинается и заканчивается в правильных сайтах и стабильный транскрипт поступает в цитоплазму, где происходит его трансляция [12]. Неправильные транс-

[1] Ранее [2] была показана специфическая транскрипция ДНК, инъецированной в ооциты Xenopus, но место транскрипции в клетке не было идентифицировано.

Таблица 1. Транскрипция генов, инъецированных в ооциты *Xenopus*[1]

Источник ДНК	Инъецированный ген	РНК-полимераза[2]	Правильные транскрипты[3]	Синтезируемые белки	Ссылки
Xenopus	рДНК	I	Некоторые[4]	—	[7]
SV40	Вирусная ДНК	II	19S и 25S	Вирусные белки и Т-антигены	[8]
Вирус полиомы	То же	II	19S и 25S	То же	[9] [10]
Аденовирус	Полный вирусный геном	II	—	Несколько ранних белков	[11]
Морской еж	Гистоновые гены	II	H2A, H2B, H3	H2A, H2B, H3	[12]
Drosophila	То же	II	—	H2A	[9]
Xenopus	»	II	H4	H4, H2A, H2B, H3, H1	[13]
Вирус герпеса	Тимидинкиназный ген	II	Некоторые[4]	Тимидинкиназа	[14]
Цыпленок	Овальбуминовый ген	II	—[5]	Овальбумин	[15]
Xenopus	5S-рРНК	III	5S-рРНК	—	[3]
Xenopus	тРНК	III	тРНК и предшественники	—	[16]
Дрожжи	тРНК	III	То же	—	[17]
Нематода	»	III	»	—	[17]

[1] См. работу [6], откуда с изменениями и дополнениями взята эта таблица.
[2] Указанная РНК-полимераза в норме транскрибирует данный ген in vivo, но отсюда не следует, что именно она используется в ооцитах *Xenopus*.
[3] Прочерк означает, что соответствующие данные отсутствуют в цитируемой работе.
[4] Как показывает анализ с помощью нуклеазы S1, синтез некоторых транскриптов инициируется правильно.
[5] Транскрипты соответствующего размера не обнаружены.

крипты, особенно с некодирующей цепи, деградируют в ядре и никогда не поступают в цитоплазму. Экспрессия инъецированных белок-кодирующих генов, содержащих интроны, была менее эффективной [6]. Возможно, это обусловлено ошибками в инициации транскрипции или в сплайсинге (см. ниже).

Инициация транскрипции инъецированного в ооцит гена, в норме транскрибируемого РНК-полимеразой II, происходит не всегда; это зависит от свойств инъецированного гена. Причины этой вариабельности пока до конца не установлены; ясно лишь, что важнейшую роль играет структура 5′-фланкирующих участков изучаемого гена (D. A. Melton, частное сообщение). Тем не менее если инициация произошла, то, по-видимому, сайт инициации транскрипции инъецированного гена соответствует нормальному сайту инициации этого гена in vivo [18—20]. Эти данные стимулировали изучение последовательностей ДНК, расположенных в 5′-направлении от сайта инициации транс-

крипции и влияющих на инициацию. Так, в работах [18, 21] было четко выявлено несколько участков в ДНК морского ежа, расположенных перед сайтом инициации транскрипции гистоновых генов, мутация в которых специфически влияет и на точное положение этого сайта (так называемый кэп-сайт), и на частоту инициации. Мак-Найт и Кингсбери [20] исследовали более тонкие эффекты модификации последовательности на транскрипцию тимидинкиназного гена вируса простого герпеса, используя систему конкуренции, когда немодифицированный ген и его модифицированные производные совместно вводили в ядра ооцитов. При такой системе обеспечивалась независимость наблюдаемых различий в экспрессии модифицированных генов от изменений объемов инъецированного материала, от различий между ооцитами и т. д. Более подробные методы, используемые для анализа инициации транскрипции, описаны в этой главе ниже.

Аналогичные подходы и аналитические методы использовались для идентификации и исследования областей, участвующих в терминации транскрипции, а также для идентификации 3′-конца РНК-транскриптов [12, 19]. Однако особенность системы ооцитов состоит в том, что проверяются только установившиеся популяции транскриптов, и поэтому очень трудно определить, соответствуют ли 5′- и 3′-концы транскриптов действительным сайтам инициации и терминации транскрипции.

Как говорилось выше, в опытах с использованием инъецированных генов тРНК было установлено, что в ядре ооцита происходит очень эффективный сплайсинг генов тРНК, содержащих интроны. Сейчас ясно, что сплайсинг происходит также и с транскриптами генов, транскрибируемых РНК-полимеразой II. Поскольку для генов, белок-кодирующие последовательности которых содержат интроны, были получены правильные продукты трансляции, это давало основания полагать, что *какое-то* количество РНК подвергается правильному сплайсингу [8, 15], однако лишь недавно этот вопрос был изучен детально [19]. Доля первичных транскриптов, подвергающихся правильному сплайсингу, варьирует, но сам факт, что правильный сплайсинг происходит с заметной эффективностью, позволяет исследовать влияние на него нуклеотидной последовательности.

3. *Транскрипты, синтезируемые РНК-полимеразой I.* Инъецированные в ооциты гены 18S- и 28S-рРНК успешно транскрибировались в них РНК-полимеразой I. Первым указанием на это послужило образование на инъецированной ДНК характерных транскрипционных комплексов [22], выявленных электронно-микроскопическими методами. Недавно были получены биохимические данные о наличии этой транскрипции и участии в ней РНК-полимеразы I [7].

Первым шагом на пути к четкой демонстрации экспрессии эукариотического гена на транскрипционном уровне явились опыты по инъекции генов 5S-рРНК в ядро ооцита [3, 23, 24]. Однако большая часть этой изящной работы была выполнена на бесклеточных системах, содержащих изолированные ядра *Xenopus*. Точно так же, по-видимому, бесклеточные системы транскрипции in vitro в принципе больше подходят для изучения регуляции транскрипции генов, транскрибируемых РНК-полимеразой II, поскольку уровень транскрипции инъецированных генов этого типа сильно варьирует от ооцита к ооциту. Тем не менее с помощью ооцитов было получено много данных о регуляторных последовательностях, участвующих в транскрипции определенных эукариотических генов, например гистоновых генов [12, 18, 21] и гена тимидинкиназы [20]. Более того, эта система все еще остается предпочтительной при исследовании сплайсинга и посттранскрипционного процессинга и транспорта, поскольку в бесклеточных системах, имеющихся в настоящее время, эти процессы не идут или идут слабо. По моему мнению, система ооцитов *Xenopus* будет и в дальнейшем применяться для изучения посттранскрипционного процессинга, а также в исследованиях сопряженной транскрипции — трансляции, где можно использовать преимущества ооцита как трансляционной системы (разд. 7).

2. Получение ооцитов и подготовка их к микроинъекции

Шпорцевые лягушки *Xenopus laevis* поставляются несколькими фирмами. Их содержат в лабораторных условиях в больших крытых баках с водой при 19—21 °С и кормят только два раза в неделю. Ооциты получают из зрелой самки *Xenopus* путем частичного или полного удаления яичника с последующим извлечением ооцитов из фолликулов — вручную или ферментативной обработкой. Преимущество частичной овариэктомии состоит в том, что при этом лягушка не погибает и ее можно повторно использовать в серии опытов. Более подробно о приобретении *X. laevis* и уходе за ними, а также о методах удаления ткани яичников и приготовления ооцитов для инъекции см. в гл. 10 (разд. 2).

3. Микроинъекция ДНК в ядра ооцитов

3.1. Необходимое оборудование

Оборудование, необходимое для микроинъекции ДНК в ядра ооцитов, состоит из стереомикроскопа, микроманипулятора, шприца, источника света, аппарата для вытягивания микропи-

петок и микрокузницы. В гл. 10 (разд. 3) описаны критерии выбора подходящего оборудования, а также даны указания к изготовлению, калибровке и хранению микропипеток.

3.2. Конформация ДНК, используемой для инъекции

С помощью методов рекомбинантных ДНК в большинстве случаев ДНК для инъекции можно получить в кольцевой форме. Кольцевая ДНК является наилучшей матрицей [6]: при инъекции линейных молекул размером менее 5000 bp образуется в 10—20 раз меньше РНК, чем при инъекции таких же ДНК в кольцевой форме, и зачастую транскрипция происходит неправильно. Если это возможно, фрагмент эукариотической ДНК следует вырезать из рекомбинантной плазмиды и вновь замкнуть ее в кольцо с помощью ДНК-лигазы. В случае генов, в норме транскрибируемых РНК-полимеразой II, такая процедура помогает избежать транскрипции этой полимеразой, начинающейся с плазмидных промоторов (правда, эта проблема возникает не всегда) [13]. Инъецируется ли замкнутая кольцевая ДНК или ДНК с одноцепочечным разрывом — не имеет значения, поскольку в ядре ооцита есть эффективная система репарации. Хорошей матрицей для транскрипции может служить даже одноцепочечная кольцевая ДНК, поскольку она переходит в двухцепочечную форму в течение 6 ч после инъекции.

3.3. Стабильность инъецированной ДНК

Кольцевая двухцепочечная ДНК, инъецированная в ядро ооцита *Xenopus*, остается интактной в течение нескольких недель, в то время как при инъекции в цитоплазму, где не происходит транскрипции, она деградирует через 48 ч. Линейная ДНК менее стабильна, чем ее кольцевая форма, независимо от того, где она находится — в цитоплазме или в ядре. Однако ухудшение ее матричных качеств обусловлено не тем, что она в большей степени, чем кольцевая ДНК, подвержена экзонуклеазному расщеплению. Обсуждение этих интересных вопросов можно найти в работе [6].

3.4. Концентрация ДНК, используемая для инъекции

В случае генов, транскрибируемых РНК-полимеразами II или III, максимум интенсивности транскрипции достигается при инъекции примерно 10 нг ДНК на ядро [6]. Однако при

инъекции в таком количестве рибосомной ДНК (транскрибируемой РНК-полимеразой 1) никакой транскрипции инъецированной ДНК не наблюдается [7]. В этом случае, напротив, нужны значительно меньшие количества ДНК: оптимальное количество равно, по-видимому, 25—50 пг ДНК на ядро. Интересно, что при инъекции таких же малых количеств генов, транскрибируемых РНК-полимеразой II или III, транскрипция отсутствует. Причины этих явлений пока малопонятны[1].

3.5. Заполнение микропипеток раствором ДНК

Для заполнения микропипеток ДНК используется тот же метод, что и в случае мРНК (гл. 10, разд. 3.3.2). Он состоит в следующем. Небольшой объем (1—2 мкл) раствора ДНК помещают на полоску парафилма или нескофилма. Микропипетку соединяют со шприцем через гибкую полиэтиленовую трубочку и заполняют парафиновым маслом. Затем, пользуясь стереомикроскопом, чтобы следить за манипуляциями, микропипеткой набирают раствор ДНК до тех пор, пока граница водный раствор/парафиновое масло не окажется у края поля зрения.

3.6. Микроинъекция

Для микроинъекции ДНК в ядра ооцитов используют главным образом два метода. Применявшийся вначале «слепой» метод (рис. 1, *А*) состоит во введении ДНК в область ооцита, занимаемую обычно ядром, причем исследователь не видит ядра во время манипуляций. Второй метод, разработанный Бирнстайлом и др. [16], представляет собой инъекцию в отцентрифугированные ооциты (рис. 1, *Б*). Во время центрифугирования ядро приближается к поверхности ооцита; его можно увидеть по просветлению пигмента на участке поверхности и инъецировать ДНК прямо в ядро. Мы опишем оба метода.

3.6.1. «Слепой» метод инъекции

Этот метод описан в табл. 2, а на рис. 1, *А* показаны нормальное положение ядра во время инъекции и его относительные размеры. Очевидно, начинающему исследователю захочется узнать, насколько хорош этот метод инъекции в ядро. Как мне кажется, для тренировочных целей очень подходит следующий прием.

---

[1] Данные о необходимости инъецирования столь малых количеств рДНК недавно подвергались критике (R. Reeder, личное сообщение).

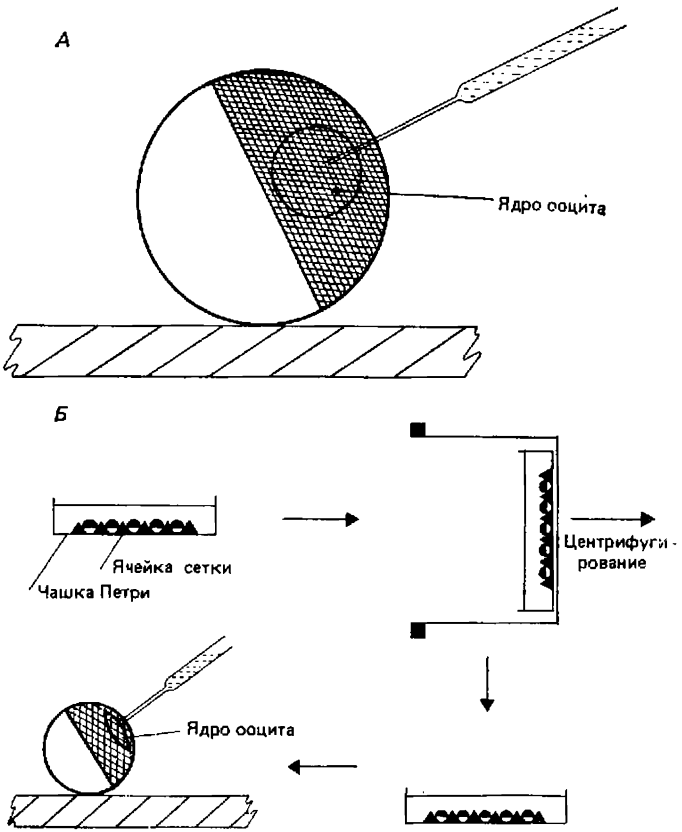


Рис. 1. Методы микроинъекции в ядро ооцита. *А*. Положение микропипетки и ооцита при инъецировании ДНК «слепым» методом (разд. 3.6.1). *Б*. Центрифугирование ооцитов перед микроинъекцией (разд. 3.6.2). Ооциты лежат на нейлоновой сетке, натянутой на дно чашки Петри, причем пигментированная половина каждого ооцита находится сверху. Чашку Петри помещают на дно 1-л стакана ротора с подвесными стаканами для центрифугирования. После центрифугирования чашку Петри вынимают и проводят инъекцию в каждый ооцит, погружая микропипетку в четко различимое уплощенное ядро. Рисунки предоставлены С. Бамрой.

1. Инъецируйте примерно 50 нл 0,2%-ного трипанового синего в буфере PBS в каждый ооцит, стараясь попасть в ядро.

2. После инъекции перенесите ооциты в модифицированный солевой раствор Барта (гл. 10, табл. 5) в чашку Петри и, пользуясь двумя пинцетами, разделите каждый ооцит на части, делая первый надрыв в вегетативной (непигментированной) половине.

Таблица 2. Микроинъекция ДНК и мечение ооцитов

ДНК для инъекции может быть растворена в разных буферах, например в 88 мМ NaCl, 0,5 мМ ЭДТА, 10 мМ HEPES (pH 7,4, доведенный КОН) или в 10 мМ NaCl, 0,5 мМ ЭДТА, pH 7,4. Вполне удовлетворительные результаты получаются и при растворении ДНК в дистиллированной воде.

«Слепой метод»

1. Перенесите ооциты на предметное стекло микроскопа, помещенное на большую чашку Петри или другую подходящую посуду, наполненную льдом. Использование такой охлажденной подставки значительно увеличивает выживаемость ооцитов после внутриядерной инъекции.
2. Захватите ооцит часовым пинцетом и поворачивайте его до тех пор, пока верхушка его пигментированной половины не будет находиться под кончиком микропипетки. Продольная ось микропипетки должна быть перпендикулярна экватору, разделяющему пигментированную и желточную полусферы (рис. 1, *А*).
3. Введите микропипетку в центр пигментированной области ооцита, следя за тем, чтобы не погрузить ее слишком глубоко. Положение ядра ооцита и его относительные размеры показаны на рис. 1, *А*.
4. Если после периода мечения должны быть проанализированы целые нефракционированные ооциты, то инъецируйте 50 нл раствора ДНК (но не более). Если же после периода мечения ооциты должны быть разделены на ядро и цитоплазму, инъецируйте не более 10 нл ДНК [19]. Чтобы пометить РНК, транскрибированную с инъецированной ДНК, одновременно с ДНК инъецируйте ^{32}P-нуклеотид (см. разд. 4.1). Можно инъецировать радиоизотоп и через 24 ч после введения ДНК (см. п. 6).
5. После инъекции[1] перенесите ооциты на чашки Петри (диаметром 2,5 см), лежащие на льду и содержащие около 5 мл модифицированного солевого раствора Барта, содержащего 10 мкг/мл пенициллина и 10 мкг/мл стрептомицина[2]. Проверьте, чтобы ооциты были погружены в раствор, и после выдерживания их в течение 30 мин на льду проинкубируйте при 20 °С.
6. Если РНК, транскрибированная с инъецированной ДНК, должна быть помечена, а меченый ^{32}P-нуклеотид не был введен вместе с ДНК (п. 4), то инъецируйте его в цитоплазму ооцита (гл. 10, разд. 3.3.3) через 24 ч после инъекции ДНК. Если должны быть помечены белки, кодируемые инъецированной ДНК, то ввести радиоактивную аминокислоту можно двумя способами: а) инъецировать ее в цитоплазму ооцита (гл. 10, разд. 3.3.3) через 24 ч после инъекции ДНК и б) добавить в модифицированный солевой раствор Барта и инкубировать ооциты в ячейке панели для микротитрования в течение 24 ч после инъекции ДНК (гл. 10, разд. 4).

Метод центрифугирования

1. Зафиксируйте хлороформом нейлоновую сетку (размер ячейки 0,8 мм) на дне пластиковой чашки Петри (диаметром 5 см)[3].
2. Залейте в чашку Петри ~7 мл модифицированного солевого раствора Барта.
3. Расположите каждый ооцит пигментированной половиной вверх.
4. Перенесите чашку на плоское дно 1-л стакана ротора с шестью подвесными стаканами от центрифуги MSE Coolspin или аналогичной центрифуги.
5. Отцентрифугируйте при 450—600 *g* 10 мин при 20 °С. Во время центрифугирования (рис. 1, *Б*) пигментированные гранулы на верхушке ооцита будут смещены поднявшимся ядром, и таким образом мишень для микроинъекций будет легко идентифицироваться (рис. 2).

6. После центрифугирования смойте ооциты со дна чашки Петри.
7. Перенесите ооциты на предметное стекло микроскопа на «холодном» предметном столике стереомикроскопа, как описано в п. 1 «слепого» метода.
8. Зажмите каждый ооцит часовым пинцетом и расположите его относительно микропипетки так, как показано на рис. 1, *Б*.
9. Введите микропипетку в ядро, стараясь не проколоть его насквозь.
10. Если целые ооциты предполагается гомогенизировать и исследовать непосредственно после периода мечения, инъецируйте до 50 нл раствора ДНК. Но если перед анализом препарат ооцитов должен быть разделен на ядерную и цитоплазматическую фракции, инъецируйте только 10 нл раствора ДНК. Следует заметить, что микроинъекцию нужно проводить в течение 45 мин после центрифугирования, поскольку ядра медленно опускаются в глубь ооцита. Чтобы пометить РНК, транскрибированную на инъецированной ДНК, инъецируйте вместе с ДНК ^{32}Р-нуклеотид (см. разд. 4.1). В альтернативном варианте радиоизотоп можно инъецировать через 24 ч после ДНК (см. п. 12).
11. После инъекции[1] поместите ооциты в модифицированный солевой раствор Барта и инкубируйте их 24 ч, как описано в п. 5 «слепого» метода.
12. Если должна быть помечена РНК, транскрибированная с инъецированной ДНК, а ^{32}Р-нуклеотид не был введен вместе с ДНК (п. 10), инъецируйте его в цитоплазму ооцита через 24 ч после инъекции ДНК (гл. 10, разд. 3.3.3). Если должны быть помечены белки, кодируемые инъецированной ДНК, то или введите меченую аминокислоту в цитоплазму ооцита (гл. 10, разд. 3.3.3) через 24 ч после инъекции ДНК, или добавьте этот изотоп в модифицированную среду Барта и инкубируйте ооциты в ячейке панели для микротитрования в течение 24 ч после инъекции ДНК (гл. 10, разд. 4).

---

[1] В одной из недавних статей рекомендуется после инъекции погружать ооциты на 90 мин в раствор 90 мМ фосфата калия (pH 7,2), 10 мМ NaCl, 1 мМ $MgSO_4$, для затягивания ранки. Однако автор не заметил улучшения результатов при использовании этой методики.

[2] Состав модифицированного солевого раствора Барта приведен в табл. 5, гл. 10.

[3] Другой тип подложки для центрифугирования можно сделать, разлив по чашкам Петри 1%-ную агарозу в модифицированном солевом растворе Барта слоем 0,2 см и затем проделав в ней ямки пастеровской пипеткой.

---

3. Если инъекция была сделана в ядро, оно будет иметь темно-голубую окраску. Если вы промахнулись, то ядро останется прозрачным, а в цитоплазме появится диффузно окрашенная область. После некоторой практики частота попаданий достигает 80%.

3.6.2. Метод центрифугирования

Этот метод описан в табл. 2 и проиллюстрирован схематически на рис. 1, *Б*. На рис. 2 показано, как выглядят ооциты после центрифугирования перед микроинъекцией. Отметим, что, хотя этот метод облегчает инъекцию ДНК в ядро ооцита, у него есть тот недостаток, что ядро легко проколоть насквозь, поскольку при центрифугировании оно значительно уплощается.

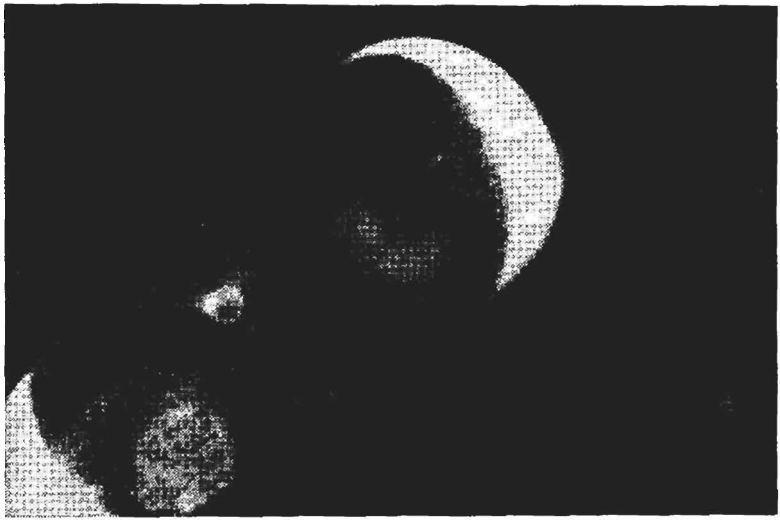


Рис. 2. Ооциты после центрифугирования. Во время центрифугирования ядро перемещается в верхнюю часть ооцита. Если перед центрифугированием ооцит расположен правильно, пигментированной половиной вверх (рис. 1, *Б*), то ядро можно выявить по положению бледного участка на верхушке пигментированной поверхности. Как видно из фотографии, когда ооцит расположен неправильно, местоположение бледного участка может быть другим.

4. Радиоактивное мечение ооцитов после инъекции

4.1. Мечение РНК, транскрибированной на инъецированной ДНК

Во многих случаях лучше метить РНК-транскрипты [α-^{32}P]-нуклеотидами, а не [^{3}H]-нуклеозидами или [^{3}H]-нуклеотидами, поскольку [^{32}P]-транскрипты можно исследовать более разнообразными методами. Не исключено, однако, что имеющиеся теперь [^{35}S]-нуклеотиды заменят соединения, меченные [^{32}P], поскольку время полураспада у [^{35}S] больше, чем у [^{32}P]. К сожалению, ооциты *Xenopus*, будучи проницаемы для нуклеозидов, непроницаемы для нуклеотидов. Поэтому [^{32}P]-нуклеотиды (обычно [α-^{32}P]-GTP или [α-^{32}P]-CTP) нужно инъецировать в ооциты для того, чтобы пометить транскрипты. Существуют две различные прописи.

1. Нуклеотиды, меченные [^{32}P], инъецируют вместе с ДНК (табл. 2) в объеме приблизительно 50 нл при концентрации 10—20 мКи/мл (>400 Ки/ммоль). Это означает, что вводится примерно 2,5 пмолей нуклеотидов на ооцит, т. е. в ~10 раз больше, чем размеры эндогенного пула [25]. При таком коли-

честве введенной метки включится около 50 000 расп/мин в РНК ооцита в течение 24 ч. Поскольку ооциты после инъекции сохраняют жизнеспособность в течение нескольких суток, а инъецированная ДНК становится эффективной матрицей для транскрипции только после образования хроматина, имеет смысл выдержать ооциты в течение 24 ч после совместной инъекции ДНК и нуклеотида, меченного [^{32}P].

2. Нуклеотиды, меченные [^{32}P], вводят через 24 ч после инъекции ДНК (табл. 2). Хотя эксперимент становится более трудоемким, в этом случае нет необходимости вводить нуклеотиды в ядро, поскольку между ядерным и цитоплазматическим пулами быстро устанавливается равновесие. Поэтому вторую инъекцию можно сделать в цитоплазму (см. гл. 10, разд. 3.3.3). Преимущество этого метода заключается в том, что радиоактивный предшественник включается более активно, чем в случае совместной инъекции, описанной выше (разд. 4.2).

4.2. Мечение белков, кодируемых инъецируемой ДНК

В гл. 10, разд. 4, обсуждаются различные аспекты мечения новосинтезированных белков в ооцитах *Xenopus*. Когда инъецированный ген кодирует полиаденилированную мРНК, то выход соответствующего белка должен быть больше, если мечение проводить спустя 24 ч после инъекции ДНК. В течение этого периода происходит накопление полиаденилированной мРНК, а нестабильные неполиаденилированные транскрипты не накапливаются (см. гл. 10, разд. 3.3).

Как и в случае мечения РНК-транскриптов (разд. 4.1), существуют две разные прописи для мечения белковых продуктов.

1. Поскольку ооциты проницаемы для аминокислот, можно просто добавлять радиоактивные аминокислоты в инкубационную среду, откуда они будут включаться в белок ооцита. Обычно концентрация радиоактивной аминокислоты составляет 0,1—5,0 мКи на 1 мл инкубационной среды (гл. 10, разд. 4.2).

2. В другом варианте радиоактивную аминокислоту (50 нл, 10 мКи/мл) инъецируют в цитоплазму ооцита (гл. 10, разд. 4.5).

Анализ меченых белков можно проводить так, как это описано в гл. 12 (разд. 5).

5. Анализ РНК-транскриптов

5.1. Выделение РНК

1. В конце периода инкубации проверьте ооциты в культуральных чашках. Отберите только ооциты, жизнеспособные на вид (см. гл. 10, рис. 9, где помещены фотографии жизнеспособ-

Таблица 3. Выделение РНК из ооцитов после инъекции

1. *Вариант для целых ооцитов.* Гомогенизируйте ооциты при концентрации 10—30 ооцит/мл в 1%-ном ДСН, 1,5 мМ $MgCl_2$, 10 мМ NaCl, 1 мг/мл протеиназы К (Calbiochem), 10 мМ трис-HCl, pH 7,6 [16]. Перед использованием этот буфер должен быть предварительно проинкубирован при 37 °С. *Вариант для раздельного анализа ядерной и цитоплазматической РНК из индивидуальных ооцитов* (см. разд. 5.1, п. 3). Проведите энуклеацию каждого ооцита, используя метод 1, описанный в гл. 10, разд. 6.1.1. Затем гомогенизируйте по отдельности ядерную и цитоплазматическую фракции в буфере, описанном выше (0,1 мл на 10 ядер или 1,0 мл на цитоплазму 30 ооцитов), содержащем также 100 мкг/мл тРНК *E. coli* в качестве носителя, в случае ядер.
2. Проинкубируйте при комнатной температуре 20 мин.
3. Добавьте 4 М NaCl до конечной концентрации 0,3 М.
4. Добавьте равный объем смеси фенол — хлороформ 1 : 1 (по объему), заранее насыщенный буфером для гомогенизации.
5. Перемешайте в течение 10 с и затем отцентрифугируйте при 10 000 *g* 1 мин.
6. Отберите верхнюю водную фазу и вновь экстрагируйте органическую фазу вместе с интерфазой 0,1 объемом 0,3 М NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 7,6. Перемешайте и отцентрифугируйте согласно п. 5.
7. Объедините две водные фазы, получившиеся в п. 5 и 6, и повторно экстрагируйте их равным объемом смеси фенол — хлороформ согласно пп. 4 и 5.
8. К объединенным водным фазам добавьте 2,5 объема этанола и оставьте на ночь при —20 °С.
9. Осадите РНК центрифугированием 10 000 *g* 2 мин.
10. Высушите осадок РНК под вакуумом и растворите его в нужном буфере. Выбор буфера зависит от метода анализа. В случае необходимости раствор ДНК можно хранить при —20 °С.

ных и нежизнеспособных ооцитов). Промойте ооциты в модифицированном солевом растворе Барта.

Далее используйте один из двух способов.

Первый способ. Для анализа суммарной РНК ооцита гомогенизируйте ооциты и выделите РНК методом, описанным в табл. 3. Мы предпочитаем использовать для этой цели незамороженные ооциты, хотя есть данные по предварительному замораживанию ооцитов в сухом льду [17].

Второй способ. Для раздельного анализа ядерной и цитоплазматической РНК энуклеируйте каждый ооцит методом, описанным в гл. 10 (разд. 6.1.1). Поскольку может происходить артефактный переход ядерных транскриптов в цитоплазму некоторых ооцитов, рекомендуется анализировать ядерную и цитоплазматическую РНК каждого ооцита индивидуально [19]. Такое «просачивание» можно обнаружить по присутствию 40S-предшественника рибосомной РНК в цитоплазматических экстрактах. РНК выделяют из индивидуальных ядер и цитоплазмы так, как это описано в табл. 3. На практике такие предосторожности имеют смысл только в случае выделения меченых РНК-транскриптов.

5.2. Характеристика РНК-транскриптов

5.2.1. Меченые РНК-транскрипты

РНК, меченую так, как это описано в разд. 4.1 и выделенную методом, приведенным в табл. 3, можно проанализировать либо сразу, с помощью электрофореза в геле, либо после предварительной гибридизации на фильтрах, содержащих специфические фрагменты ДНК, и элюции с них. Последний метод описан в табл. 4. Результаты анализа такого рода представлены на рис. 3.

Таблица 4. Анализ специфических транскриптов методом элюции гибридов

1. Растворите комплементарную ДНК (в двух- или одноцепочечной форме) в воде и прогрейте при 100 °С 10 мин. Быстро охладите во льду.
2. Профильтруйте ДНК через нитроцеллюлозный фильтр (HAWP; 1,3 см диаметром) и затем прогрейте фильтры при 80 °С 2 ч.
3. Поместите каждый фильтр на плоское дно пластикового флакона для сцинтилляционного счетчика. Добавьте 20—100 мкг РНК ооцитов на 200 мкл раствора 0,4 М NaCl, 0,2%-ного ДСН, 10 мМ PIPES (pH 6,4). Проинкубируйте при 50 °С 2 ч.
4. Промойте каждый фильтр шесть раз по одной минуте в 1×SSC[1] при 60 °С, дважды в 0,2×SSC при 60 °С и затем один раз в 5 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА, 20 мМ трис-HCl pH 7,7 при 50 °С.
5. Элюируйте гибридизовавшиеся РНК-транскрипты, проведя две последовательные инкубации в течение 1 мин при 100 °С в 0,2 мл воды. Элюаты объедините. Добавьте 10 мкг тРНК *E. coli* в качестве носителя и 2,5 объема этанола для осаждения нуклеиновой кислоты (табл. 3, п. 8).
6. Осадите нуклеиновую кислоту и растворите ее в буфере (табл. 3, пп. 9 и 10), прежде чем проводить электрофорез в полиакриламидном геле (см., например, гл. 4, табл. 8) или использовать метод трансляции (гл. 8, разд. 2.6.2).

[1] 1×SSC — буфер следующего состава: 0,15 М NaCl, 15 мМ цитрат натрия (трехзамещенный).

5.2.2. Немеченые РНК-транскрипты

В альтернативном варианте после инъекции ДНК ооциты инкубируют в отсутствие радиоактивного нуклеотида. После экстракции РНК методом, описанным в табл. 3, немеченые РНК-транскрипты можно проанализировать различными способами.

1. *Норсерн-блоттинг.* Этот метод, описанный подробно в табл. 5, включает электрофорез РНК-транскриптов в агарозном геле с последующим переносом РНК на нитроцеллюлозный фильтр. Затем РНК на фильтре инкубируют в присутствии соответствующей меченой денатурированной ДНК-зонда, с которой нужные РНК-транскрипты гибридизуются. Этот метод

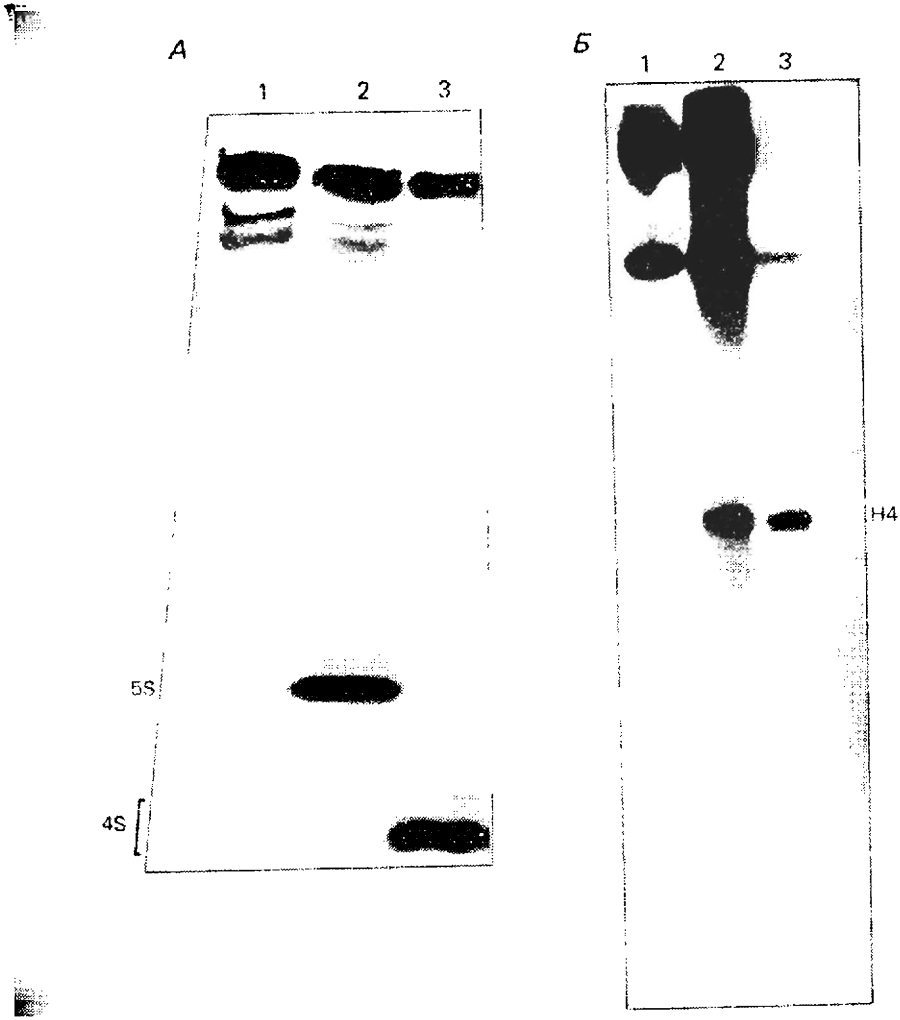


Рис. 3. Синтез РНК в ооцитах. *А*. В ооциты инъецируют дистиллированную воду (дорожка 1), ДНК *Xenopus*, кодирующую 5S-рРНК (дорожка 2), или ДНК *Xenopus*, кодирующую тРНК (дорожка 3). Одновременно инъецируют [^{3}H]-GTP. После инкубации в течение 24 ч РНК экстрагируют так, как описано в табл. 3, и анализируют методом электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле с последующей флюорографией. *Б*. В ооциты одновременно инъецируют ДНК гистона Н4 *Xenopus* и [α-^{32}P]GTP. После инкубации в течение 24 ч РНК экстрагируют методом, описанным в табл. 3. Одну пробу РНК (дорожка 2) анализируют непосредственно методом электрофореза (рис. *А*), а со второй (дорожка 3) сначала проводят гибридизацию с ДНК гистона Н4, иммобилизованной на нитроцеллюлозном фильтре, а затем элюируют. На дорожке 1 показана нефракционированная РНК (т. е. соответствующая дорожке 2) из ооцитов, в которые был инъецирован только [α-^{32}P]-GTP. Данные были любезно предоставлены Р. Олдом.

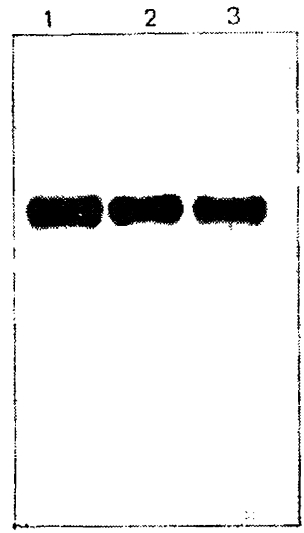


Рис. 4. Анализ РНК ооцитов методом нозерн-блот-гибридизации. В каждый ооцит инъецировали по 2 нг глобиновой мРНК кролика и выделяли РНК через 0 ч (дорожка 1), 24 ч (дорожка 2) и 48 ч (дорожка 3) после инъекции. Затем проводили электрофорез РНК в 1,5%-ном агарозном геле с формальдегидом, переносили РНК на нитроцеллюлозный фильтр и проводили гибридизацию с глобиновой ДНК, меченной ^{32}P (табл. 5).

позволяет обнаруживать транскрипты, которые содержат участки, комплементарные одной из цепей ДНК-зонда, и определять их размеры. При тщательном исполнении этот метод может быть количественным. Пример анализа такого рода приведен на рис. 4.

Если необходимо узнать, какой именно цепи комплементарен транскрипт, то можно использовать одноцепочечные ДНК-зонды. Их получают либо путем электрофореза меченой ДНК-зонда в денатурирующем агарозном геле с последующей элюцией отдельных цепей ДНК, либо используя одноцепочечную рекомбинантную ДНК колифага M13 в качестве матрицы для синтеза меченой комплементарной цепи ДНК [28].

2. *Идентификация 5′-конца РНК-транскриптов.* Для идентификации на инъецированном гене области, соответствующей 5′-концу РНК-транскрипта, используют два метода: картирование с помощью S1-нуклеазы и наращивание затравки.

Принцип S1-нуклеазного картирования подробно описан в разд. 5.2.1 гл. 5. Здесь возможны два подхода: в первом случае используют немеченую ДНК-зонд для анализа меченых радиоактивных РНК-транскриптов (гл. 3, разд. 3.3), во втором — меченую ДНК-зонд для анализа немеченых РНК-транскриптов. Чаще используется второй метод. Вначале проводят гибридизацию РНК-транскриптов с меченой радиоактивной ДНК-зондом, комплементарной 5′-концу гена и фланкирующей с 5′-конца последовательности. Затем смесь инкубируют с нуклеазой S1, которая расщепляет только одноцепочечную ДНК,

Таблица 5. Норсерн-блот-гибридизация

1. Приготовьте следующие концентрированные растворы:
   Буфер MOPS для геля
   Состав буфера: 1 мМ ЭДТА, 5 мМ ацетат натрия, 20 мМ MOPS (pH 7,0). Этот буфер нужно приготовить в виде растворов с 10- и 14,3-кратной концентрацией:

	10×MOPS-буфер	14,3×MOPS-буфер
MOPS	41,9 г	5,93 г
Ацетат натрия	4,1 г	0,58 г
ЭДТА·Na_2	3,7 г	0,50 г
H_2O	до 1 л	до 100 мл

   Буфер для нанесения
   Смешайте:
   500 мкл деионизованного формамида[1]
   70 мкл 14,3×MOPS-буфера
   180 мкл профильтрованного формальдегида[2]
   Буфер для гибридизации
   50%-ный по объему деионизованный формамид[1]
   50 мМ натрий-фосфатный буфер (pH 6,8)
   5×SSC[3]
   0,02%-ный бычий сывороточный альбумин
   0,02%-ный поливинилпирролидон
   0,02%-ный фикол (мол. масса 400 000)
   100 мкг/мл обработанной ультразвуком денатурированной ДНК спермы лосося (Sigma)
   Буфер для промывки
   50 мМ трис-HCl, pH 7,6
   2 мМ ЭДТА
   0,5%-ный пирофосфат натрия (четырехзамещенный)
   0,02%-ный бычий сывороточный альбумин
   0,02%-ный поливинилпирролидон
   0,02%-ный фикол (мол. масса 400 000)
2. Растворите 3 г агарозы в 20 мл 10×MOPS-буфера и 144 мл дистиллированной воды с помощью кипячения. Охладите до 60 °C.
3. Добавьте 36 мл профильтрованного формальдегида[2] и вылейте агарозу в стандартную форму для горизонтального геля.
4. Смешайте 5,5 мкл каждой пробы РНК (<20 мкг), растворенной в воде, с 16,5 мкл буфера для нанесения.
5. Прогрейте пробы РНК при 60 °C 5 мин и быстро охладите во льду.
6. Добавьте по 5 мкл глицерола, содержащего 0,05% (вес/объем) бромфенолового синего, к каждой пробе.
7. Нанесите каждую пробу в отдельную лунку геля и проводите электрофорез при 50 мА, пока бромфеноловый синий не достигнет края геля.
8. Снимите гель и погрузите его в 1%-ный глицин на 60 мин.
9. Если нужно сфотографировать этот гель, добавьте бромистый этидий до концентрации 2 мкг/мл и проведите окрашивание при комнатной температуре 15 мин. Промойте гель три раза дистиллированной водой по 15 мин. Сфотографируйте его в УФ-свете (см. разд. 2.8 работы [27]).
10. Погрузите гель (окрашенный) в 20×SSC на 10—20 мин.
11. Перенесите РНК из геля на нитроцеллюлозный фильтр (Schleicher and Schuell, BA85), используя стандартный метод переноса по Саузерну (см. работу [26] и разд. 2.10 в работе [27]). Буфер для переноса — 20×SSC.
12. После переноса прогрейте фильтр в течение 2 ч при 80 °C.
13. Проведите предгибридизацию в гибридизационном буфере не менее 8 ч при 42 °C в заплавленном пластиковом пакете.

14. Удалите гибридизационный буфер и замените его следующей смесью: 4 объема свежего буфера, 1 объем 50%-ного (вес/объем) декстрансульфата (мол. масса 500 000, Sigma) и 0,1 объема денатурированной (100 °С, 5 мин) меченой ДНК-зонда. Проведите гибридизацию в течение ~20 ч при 42 °С.
15. Промойте фильтр 4 раза при комнатной температуре 2×SSC, 0,1%-ным ДСН (каждая промывка 5 мин), затем 2 раза при 50 °С 0,1×SSC, 0,1%-ным ДСН (каждая промывка 15 мин).
16. Заверните сырой фильтр в специальную пленку Saran или какую-либо другую тонкую пленку и экспонируйте с ним рентгеновскую пленку при —70 °С с усиливающим экраном, содержащим вольфрамат кальция (например, Fuji Mach 2 или DuPont Cronex Lightning Plus).

Один фильтр можно использовать повторно с разными ДНК-зондами для обнаружения других РНК-транскриптов. Для этого следует удалить меченый зонд с фильтра, промыв его в (0,05—0,1)×буфере для промывки при 65 °С 1—2 ч, затем провести предгибридизацию и проинкубировать его с другой меченой ДНК-зондом, как описано выше.

[1] Деионизованный формамид получают следующим образом. Встряхивайте 100 мл формамида с 5 г ионообменной смолы (например, Amberlite MB3) 30 мин при комнатной температуре. Профильтруйте формамид и храните его порциями при —20 °С.
[2] Перед использованием профильтруйте формамид через обезжиренный фильтр.
[3] 1×SSC — это 0,15 М NaCl, 15 мМ цитрат (трехзамещенный).

Таблица 6. Картирование 5′- и 3′-концов РНК-транскриптов с помощью нуклеазы S1

1. Осадите этанолом (табл. 3, пп. 8 и 9) и меченую ДНК-зонд, и РНК-транскрипт.
2. Растворите каждый осадок в небольшом объеме буфера для гибридизации[1] (1 мМ ЭДТА, 0,4 М NaCl, 80%-ный деионизованный формамид, 40 мМ PIPES, pH 6,4).
3. Смешайте 5 мкл (20 мкг) РНК с 2 мкл (~100 нг) ДНК-зонда.
4. Перенесите смесь в стеклянный капилляр и на огне заплавьте оба конца.
5. Проинкубируйте капилляр при 80 °С 10 мин и сразу, не дав остыть, перенесите его в температуру 52 °С. Проинкубируйте при 52 °С 5 ч.
6. После гибридизации смешайте 1 мкл нуклеазы S1 (~1000 ед/мкл, Sigma) с 900 мкл буфера для S1 (0,28 М NaCl, 4,5 мМ $ZnSO_4$, 20 мкг/мл обработанной ультразвуком денатурированной ДНК спермы лосося, 50 мМ ацетат натрия, pH 4,6). Разделите раствор на аликвоты по 150 мкл.
7. Перенесите содержимое одной капиллярной трубочки (п. 5) в аликвоту буфера с нуклеазой S1 объемом 150 мкл (п. 6).
8. Проинкубируйте при 37 °С 30 мин.
9. Остановите реакцию добавлением 6 мкл 0,2 М ЭДТА.
10. Проведите экстракцию одним объемом смеси фенол — хлороформ (1 : 1) и осадите этанолом нуклеиновую кислоту из водной фазы (табл. 3, пп. 8 и 9).
11. Ресуспендируйте осадок в 2 мкл воды и проведите анализ нуклеиновой кислоты в полиакриламидном «секвенирующем» геле (см. разд. 3 работы [29] и гл. 5, табл. 10).

[1] Этот буфер готовят, растворяя 1,2 г PIPES и 2,3 г NaCl в 10 мл 10 мМ ЭДТА и 80 мл деионизованного формамида (см. табл. 5, сноску 1). Это занимает около 15 мин. Доведите pH до 6,4 концентрированным NaOH и затем добавьте дистиллированную воду до конечного объема 100 мл.

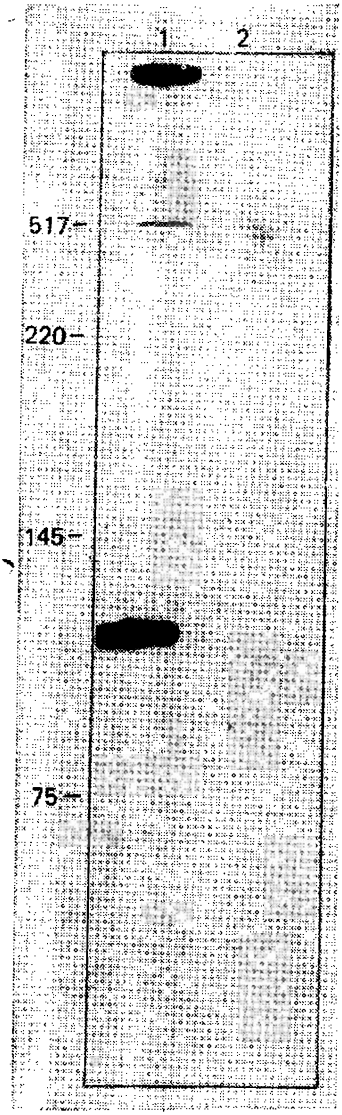


Рис. 5. S1-нуклеазное картирование РНК ооцитов. Рекомбинантную ДНК, содержащую *tk*-ген вируса простого герпеса, инъецируют в ооциты и через 24 ч выделяют из них РНК. РНК гибридизируют с ДНК-зондом, меченной по 5′-концу дистальнее *tk*-промотора. Получившийся гибрид обрабатывают нуклеазой S1, денатурируют и анализируют методом электрофореза в 12%-ном полиакриламидном «секвенирующем» геле (табл. 6). Длина основного защищенного фрагмента (дорожка 1) равна 95 оснований; это означает, что 5′-конец основного транскрипта находится на расстоянии 95 bp левее меченого 5′-конца зонда. Дорожка 2 — контроль; в этом опыте была взята РНК, выделенная из ооцитов после инъекции в них воды. Указаны также размеры (в bp) соответствующих маркерных фрагментов ДНК.

но не ДНК в составе гибридов; устойчивой к расщеплению будет только часть молекулы ДНК-зонда, гибридизовавшаяся с РНК-транскриптом. Далее с помощью электрофореза в геле определяют размеры устойчивого к нуклеазе фрагмента ДНК. Соотнося размеры этого фрагмента с размерами исходной ДНК-зонда, можно идентифицировать в пределах ДНК-зонда сайт,

Таблица 7. Картирование 5′ и 3′-концов РНК-транскриптов методом наращивания затравки

1. Приготовьте короткий фрагмент (30—80 bp) ДНК, соответствующий последовательности вблизи предполагаемого сайта кэпирования изучаемого гена. Пометьте 5′-концы, используя Т4-полинуклеотидкиназу и [γ-^{32}P]-АТР, и затем отделите одиночные цепи, комплементарные РНК-транскрипту, путем электрофореза в денатурирующем «секвенирующем» геле (гл. 5, табл. 10). В идеале, чтобы облегчить разделение цепей, нужно выбрать такие ферменты рестрикции для получения фрагмента ДНК, чтобы комплементарные цепи имели разную длину.
2. Смешайте:
   1—3 мкл ДНК-затравки с меченым 5′-концом
   2 мкл 5-кратного гибридизационного буфера (2 М NaCl, 50 мМ PIPES, pH 6,4)
   5—10 мкг суммарной РНК (табл. 3, п. 9)
   дистиллированную воду до 10 мкл
3. Проведите гибридизацию в запаянном стеклянном капилляре минимум 5 ч. Чтобы выбрать точную температуру гибридизации, нужно провести предварительные эксперименты, но во многих случаях считается приемлемой температура 70 °С. В гибридизационную смесь можно ввести 50%-ный формамид (деионизованный так, как описано в табл. 5), что позволит снизить температуру гибридизации до ~42 °С. При использовании формамида нуклеиновые кислоты перед гибридизацией нужно осадить этанолом (табл. 3, пп. 8 и 9), чтобы удалить остаточный формамид, который будет оказывать ингибирующее действие в последующих реакциях наращивания затравки. Осадок нуклеиновых кислот ресуспендируйте в 10 мкл 1-кратного гибридизационного буфера. Наконец, в гибридизационную смесь при необходимости можно добавить ДСН до конечной концентрации 1% для ингибирования РНКазы.
4. После гибридизации разбавьте 10 мкл гибридизационной смеси в 80 мкл «основной смеси» в силиконизированной пробирке от микроцентрифуги. Состав «основной смеси»:
   10 мМ ДТТ
   6 мМ $MgCl_2$
   25 мкг/мл актиномицина D
   по 0,5 мМ dATP, dGTP, dTTP, dCTP
   50 мМ трис-HCl, pH 8,2
5. Добавьте 5 ед. обратной транскриптазы вируса птичьего миелобластоза (AMV).
6. Проинкубируйте 1 ч при 42 °С.
7. Добавьте 0,1 объема 3М ацетата натрия, pH 5,6. Перемешайте и экстрагируйте одним объемом смеси фенол — хлороформ (1 : 1).
8. Отберите водную фазу и осадите нуклеиновую кислоту добавлением 2,5 объемов этанола с последующим центрифугированием и высушиванием осадка (табл. 3, пп. 8—10).
9. Растворите осадок в соответствующем объеме буфера для электрофореза и проведите электрофорез в 12%-ном полиакриламидном «секвенирующем» геле (разд. 3 работы [29]).

соответствующий 5′-концу РНК-транскрипта. Существует несколько рабочих модификаций основной методики S1-нуклеазного картирования с применением меченых радиоактивных ДНК-зондов. Методика, которой пользуемся мы, описана в табл. 6, а соответствующий пример показан на рис. 5. Альтернативный метод излагается в гл. 5, табл. 10.

В методе наращивания затравки метят 5′-конец короткого фрагмента (30—80 bp) ДНК, соответствующего последовательности вблизи ожидаемого кэп-сайта исследуемого гена, и затем проводят очистку одиночных цепей, комплементарных РНК-транскрипту, на денатурирующем «секвенирующем» геле. Далее очищенную цепь гибридизуют с РНК-транскриптами и наращивают в присутствии немеченых дезоксирибонуклеотидов и обратной транскриптазы. Процесс наращивания продолжают до тех пор, пока не будет достигнут 5′-конец транскрипта. Размеры меченой достроенной затравки можно точно определить, используя денатурирующий «секвенирующий» гель. Таким образом точно идентифицируется 5′-конец транскрипта. Рабочая методика наращивания затравки приводится в табл. 7.

Вероятно, наращивание затравки — более подходящий метод для точной локализации сайта кэпирования, поскольку при правильном выборе затравки наращенные сегменты будут относительно короткими, и, следовательно, их размер можно точно определить методом гель-электрофореза. Достроенную затравку можно также секвенировать методом Максама — Гилберта [29]. Однако, если положение сайта кэпирования неизвестно, лучше использовать S1-нуклеазное картирование, поскольку при этом не требуется разделения цепей, которое зачастую является весьма трудным делом.

3. *Идентификация 3′-конца РНК-транскрипта.* Наращивание затравки из-за полярности этого процесса нельзя использовать для индентификаии 3′-конца транскрипта. Для этой цели подходит только картирование с помощью нуклеазы S1. Этот метод используется точно в таком виде, в каком он описан в табл. 7, за исключением того, что ДНК-зонд должна иметь радиоактивно меченный 3′-конец. Мечение проводят, используя фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I и [α-^{32}P]-дезоксинуклеозидтрифосфаты [29]. Примеры применения этого метода описаны в работе [19].

5.3. Идентификация РНК-полимераз, участвующих в транскрипции

Три эукариотические РНК-полимеразы по-разному ингибируются грибным токсином α-аманитином. Активность РНК-полимеразы II подавляется при концентрации 1 мкг/мл, РНК-полимеразы III — при концентрации 100 мкг/мл, а РНК-полимераза I остается активной вплоть до концентрации 1 мг/мл. Это позволяет использовать α-аманитин для идентификации фермента, осуществляющего транскрипцию специфических типов РНК в ооцитах после инъекции. При совместной инъекции в ооциты α-аманитина в концентрации 40 мкг/мл и ДНК тран-

скрипция при участии РНК-полимеразы II будет полностью подавлена, а введение α-аманитина в концентрации 100 мкг/мл приведет к снижению синтеза тРНК и 5S-рРНК на 90%.

6. Анализ посттранскрипционного процессинга

Некоторые особенности ооцитов *Xenopus* позволяют проводить на них тонкие исследования посттранскрипционного процессинга. Во-первых, в ядре ооцита может осуществляться правильный процессинг первичных транскриптов [17, 19]. Во-вторых, благодаря большим размерам ядра облегчается инъекция ДНК и удается инъецировать также РНК, которая подвергается процессингу в ооците. Таким образом, можно пойти как бы в обход транскрипции. Наконец, быстрое разделение вручную ядра и цитоплазмы позволяет отличать процессинг, идущий в ядре, от процессинга, идущего в цитоплазме [17].

Существует несколько типов посттранскрипционного процессинга: присоединение остатков 7-метилгуанозина к 5′-концам многих первичных транскриптов («кэпирование»), полиаденилирование, процессивная терминация и сплайсинг.

На сегодняшний день наибольших успехов в исследовании посттранскрипционных процессов с помощью ооцитов *Xenopus* удалось достичь в анализе сплайсинга РНК. Положения 5′- и 3′-сайтов сплайсирования, участвующих в образовании зрелого транскрипта, можно определить с помощью S1-нуклеазного картирования, используя зонды, меченные соответственно по 3′- и 5′-концам (см. разд. 5.2.2, п. 2 и 5.2.2, п. 3). В работе [19] была проведена количественная оценка нормального сплайсинга РНК, транскрибированных с инъецированных матриц. Однако для детального анализа механизмов сплайсинга РНК процессы транскрипции и процессинга нужно разделить. Лучше всего это сделать путем инъекции предшественника мРНК в ядро ооцита. Такой анализ был выполнен в работе [30] на предшественнике мРНК для β-глобина человека с использованием системы in vitro для получения больших количеств предшественника мРНК. Читателю лучше ознакомиться с самой работой, где описаны эти методы, поскольку мы не имеем опыта выбора необходимых систем транскрипции.

Наконец, говоря о терминации, нужно отметить, что, хотя 3′-концы РНК транскриптов удается индентифицировать (разд. 5.2.2, п. 3), они, по-видимому, не соответствуют сайту терминации генов, транскрибируемых РНК-полимеразой II, поэтому необходимо установить аутентичный сайт терминации. Ооцит безусловно окажется великолепной системой для изучения требований, предъявляемых к последовательностям при терминации, и участия в ней других факторов (разд. 8).

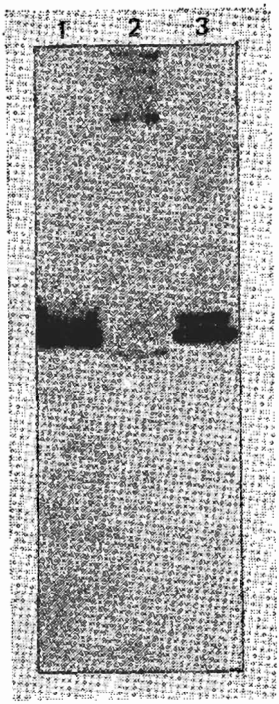


Рис. 6. Исследование сопряженной транскрипции — трансляции. В ооциты инъецировали рекомбинантную ДНК, содержащую последовательности кДНК овальбумина цыпленка. После инкубации в течение 24 ч в нерадиоактивной среде был добавлен [^{35}S]-метионин и инкубацию проводили еще 24 ч. Затем были выделены следующие фракции: инкубационная среда (дорожка 1), цитозоль (дорожка 2) и мембраны (дорожка 3). Проведены иммунопреципитация этих фракций антиовальбуминовыми антителами и электрофорез (гл. 10, разд. 5.5). Эти данные четко указывают на присутствие овальбумина в мембране и в секретируемом (инкубационная среда) материале.

7. Использование системы ооцитов для исследований сопряженной транскрипции — трансляции

В гл. 10 описаны достоинства ооцита как системы для исследования трансляции инъецированной мРНК. По многим причинам эта система имеет преимущества перед другими и при исследовании сопряженной транскрипции — трансляции. Во-первых, в тех случаях, когда in vivo уровень экспрессии гена очень низок, инъецированная в ооциты *Xenopus* клонированная ДНК может быть выведена из-под нормального контроля. Это может привести к синтезу большего количества белка и, таким образом, облегчит биохимическое изучение продукта инъецированного гена. Во-вторых, внося мутации в ДНК in vitro и инъецируя ее затем в ооциты *Xenopus*, можно определять последовательности ДНК, важные для внутриклеточной компартментализации, активности ферментов и т. п.

Методы радиоактивного мечения белковых продуктов в ооцитах *Xenopus* и их последующий анализ описаны в разд. 4.2 этой главы, а более всесторонне — в гл. 10 (разд. 4). Пример такой сопряженной системы представлен на рис. 6, где в ядра

ооцитов была инъецирована ДНК, содержащая последовательность полноразмерной кДНК овальбумина цыпленка. Не надо забывать две потенциальные проблемы, связанные с использованием системы ооцитов для изучения сопряженной транскрипции — трансляции. Во-первых, мы, а также другие исследователи [11] обнаружили, что трансляция мРНК, соответствующей инъецированной ДНК, в ооцитах существенно различается для разных партий ооцитов. Поэтому по возможности нужно повторно использовать лягушек, для ооцитов которых наблюдался высокий уровень продуктов трансляции инъецированной ДНК (гл. 10, разд. 2.2.1). Во-вторых, накопление продукта трансляции, по-видимому, очень сильно зависит от концентрации инъецируемой ДНК (J. Davey, A. Wilson, частное сообщение). Таким образом, хотя мы работали с концентрациями ДНК, рекомендуемыми в разд. 3.4, использование более высоких концентраций (например, 1 мг/мл) может в случае некоторых ДНК привести к снижению синтеза белка. Причина этого не ясна.

8. Исследование регуляторных белков

Ооцит *Xenopus* является отличным объектом для изучения транскрипции и посттранкрипционных процессов, осуществляющихся после инъекции определенных ДНК или РНК. Совсем недавно в этой работе были достигнуты новые успехи: изучено влияние белков на инициацию [31] и на терминацию [32] транскрипции с использованием в качестве матрицы инъецированной ДНК. В этих опытах совместная инъекция ДНК и различных белковых фракций, получаемых в процессе разделения, была использована для идентификации и очистки активных регуляторных белков. Ясно, что система ооцитов *Xenopus* еще не исчерпала всех своих возможностей при изучении транскрипции.

Литература

1. *Mertz J. E., Gurdon J. B.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 1502 (1977).
2. *Colman A.* Eur. J. Biochem., **113**, 339 (1975).
3. *Gurdon J. B., Brown D. D.* Dev. Biol., **67**, 346 (1978).
4. *Kressmann A., Birnstiel M. L.* In: Transfer of Cell Constitutents into Eukaryotic Cells, Celis J., Graessmann A. and Loyter A. (eds.), Plenum Press, New York, p. 383, 1980.
5. *Wickens M. P., Laskey R. A.* In: Genetic Engineering, vol. I, Williamson R. (ed.), Academic Press Inc., New York and London, p. 103, 1981.
6. *Gurdon J. B., Melton D. A.* Annu. Rev. Genet., **15**, 189 (1981).
7. *Moss T.* Cell, **30**, 835 (1982).
8. *Rungger D., Turler H.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 6073 (1978).
9. *De Robertis E., Mertz J.* Cell, **12**, 175 (1978).

10. *Lasky R. A., Honda B. M., Mills A. D., Morris N. R., Wyllie A. H., Mertz J., De Robertis E., Gurdon J. B.* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 42, 171 (1978).
11. *Asselbergs F. A. M., Smart J. E., Mathews M. B.* J. Mol. Biol., **163**, 209 (1983).
12. *Probst E., Kressmann A., Birnstiel M. L.* J. Mol. Biol., **135**, 709 (1979).
13. *Old R. W., Woodland H. R., Ballantine J. E. M., Aldridge T. C., Newton C. A., Bains W. A., Turner P. C.* Nucleic Acids Res., **10**, 7561 (1982).
14. *McKnight S. L., Garvis E. R.* Nucleic Acids Res., **8**, 5931 (1980).
15. *Wickens M. P., Woo S., O'Malley B. W., Gurdon J. B.* Nature, **285**, 628 (1980).
16. *Kressmann A., Clarkson S. G., Pirotta V., Birnstiel M. L.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1176 (1978).
17. *Melton D. A., Cortese R.* Cell, **18**, 165 (1979).
18. *Grosschedl R., Birnstiel M. L.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1432 (1980).
19. *Wickens M. P., Gurdon J. B.* J. Mol. Biol., **163**, 1 (1983).
20. *McKnight S., Kingsbury R.* Science (Wash.), **217**, 316 (1982).
21. *Grosschedl R., Birnstiel M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 7102 (1980).
22. *Trendelenburg M. F., Gurdon J. B.* Nature, **276**, 292 (1978).
23. *Bogenhagen D. F., Brown D. D.* Cell, **24**, 261 (1981).
24. *Bogenhagen D. F., Sakonju S., Brown D. D.* Cell, **19**, 27 (1980).
25. *Woodland H., Pestell R.* Biochem. J., **127**, 597 (1972).
26. *Thomas P.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 5201 (1980).
27. *Sealey P. G., Southern E. M.* In: Gel Electrophoresis of Nucleic Acids — A Practical Approach, Rickwood D. and Hames B. D. (eds.), IRL Press, Oxford and Washington DC, p. 39, 1982.
28. *Messing J.* In: Third Cleveland Symposium on Macromolecules: Recombinant DNA, Walton A. (ed.), Elsevier, Amsterdam, p. 143, 1981.
29. *Davies R. W.* In: Gel Electrophoresis of Nucleic Acids A Practical Approach, Rickwood D. and Hames B. D. (eds.), IRL Press, Oxford and Washington DC, p. 117. 1982.
30. *Green M., Maniatis T., Melton D.* Cell, 32, 681 (1983).
31. *Jones N., Richter J., Weeks D., Smith L.* J. Mol. Biol. (1983), in press.
32. *Stunnenberg H., Birnstiel M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 6201 (1982).

ТРАНСКРИПЦИЯ ГЕНОВ ЭУКАРИОТ В БЕСКЛЕТОЧНЫХ ЭКСТРАКТАХ

Дж. Мэнли

1. Введение

В эукариотических клетках идентифицированы ядерные ДНК-зависимые РНК-полимеразы трех классов [1]. РНК-полимераза I катализирует синтез предшественников рибосомной РНК (рРНК), РНК-полимераза II транскрибирует преимущественно гены, кодирующие информационную, или матричную, РНК (мРНК), а транскрипция РНК-полимеразой III приводит к образованию транспортных РНК (тРНК), 5S-РНК и некоторых других небольших РНК с неизвестной функцией. Уже давно стало ясно, что для изучения механизмов транскрипции, а также для идентификации факторов и нуклеотидных последовательностей, регулирующих генную экспрессию, потребуются бесклеточные системы, в которых точно и специфично транскрибируется экзогенная ДНК. В ранних работах этого направления использовали очищенные РНК-полимеразы, что не привело к успеху. Однако в последние годы разработаны бесклеточные системы, в которых удается проводить точную транскрипцию при участии РНК-полимераз всех трех типов. Плодотворными оказались два основных подхода. В одном случае к очищенной РНК-полимеразе добавляют бесклеточные экстракты, содержащие факторы, необходимые для точной транскрипции [2]. Этот метод достаточно трудоемок, поскольку получать в больших количествах очищенную активную РНК-полимеразу не так просто. Другой подход заключается в получении концентрированных клеточных экстрактов, содержащих не только факторы, необходимые для транскрипции, но и достаточные количества РНК-полимеразы, так что здесь добавления очищенного фермента не требуется. Для РНК-полимераз I [3] и III [4] такие системы можно просто получить из цитоплазматических экстрактов, поскольку большие количества этих полимераз и необходимые для них факторы выходят из ядра при гипотонических концентрациях соли. В то же время РНК-полимераза II при этом почти полностью остается внутри ядра. Поэтому экстракты, содержащие этот фермент, необходимо готовить из целых клеток [5]. Способ получения и свойства экстракта, содержащего все факторы и ферменты, необходимые для точной и специфической транскрипции РНК-полимеразами I, II и III и для полиаденилирования предшественников мРНК, описаны ниже.

До настоящего времени в большинстве экспериментов использовали экстракты, выделенные из человеческих клеток, растущих в суспензии (HeLa или KB-клетки). Такие экстракты имеют очень широкую видоспецифичность в отношении РНК-полимераз II и III. В экстрактах из клеток HeLa точно транскрибируются гены практически всех проверенных высших эукариот, считываемые РНК-полимеразой III. В бесклеточных экстрактах из целых клеток не обнаружена точная транскрипция генов дрожжей РНК-полимеразой II, но было показано, что в них происходит транскрипция генов фиброина шелка *Bombyx mori* [6] и кональбумина цыпленка [7], а также многих других генов высших эукариот и вирусов эукариот.

Конечно, для синтеза зрелых молекул РНК требуются дополнительные ферменты и факторы, отличающиеся от факторов, необходимых для точной инициации транскрипции, например ферменты, осуществляющие процессинг РНК. Экстракты клеток HeLa, по-видимому, содержат практически все ферменты, нужные для процессинга тРНК, в том числе ферменты сплайсинга пре-тРНК [8]. Эксперименты на системах с РНК-полимеразой I только начинаются, но уже есть указания на то, что соответствующие экстракты содержат по крайней мере один фермент для процессинга предшественников рРНК [9, 10]. Наконец, транскрипты, синтезируемые в бесклеточных экстрактах РНК-полимеразой II, кэпируются и метилируются по 5′-концам [2, 5], и недавно разработаны условия для эффективного и точного полиаденилирования предшественников мРНК [11]. Тем не менее, хотя в нескольких работах высказывается предположение о сплайсинге новообразованной РНК [12—14], наблюдавшаяся активность, ответственная за этот процесс, была низка и сплайсинг достоверно не воспроизводился.

В растворимых транскрипционных системах в бесклеточных условиях может воспроизводиться ряд этапов, необходимых in vivo для синтеза зрелой РНК (см. обзор [15]). Эти системы используются для идентификации и характеристики факторов, необходимых для синтеза РНК, идентификации нуклеотидных последовательностей, регулирующих генную экспрессию, и для выяснения механизмов регуляции генной экспрессии.

2. Получение и использование бесклеточного экстракта для транскрипции РНК-полимеразой II

2.1. Получение экстракта

Экстракты получают несколько модифицированным методом Сагдена и Келлера [16], которые использовали его в качестве первой стадии очистки РНК-полимеразы. Они работали с клет-

Таблица 1. Приготовление бесклеточных экстрактов из целых клеток

1. Нарастите клетки HeLa (2—25 л) до плотности $4—8 \cdot 10^5$ клеток/мл в суспензионных культурах на минимальной среде Игла с добавлением 5% лошадиной сыворотки. По-видимому, плотность клеток не имеет особого значения; правда, отмечено, что наиболее активные экстракты были получены с клетками, собранными на нижней границе указанных пределов плотности. Описанные ниже процедуры проводите при 0—4 °С.
2. Отцентрифугируйте клетки при 1000 *g* 15 мин и промойте их дважды солевым раствором, забуференным фосфатным буфером.
3. Ресуспендируйте клетки в 4-кратном по сравнению с клеточным осадком растворе 10 мМ трис-HCl, pH 7,9, 1 мМ ЭДТА и 5 мМ ДТТ ($6 \cdot 10^8$ клеток соответствуют приблизительно 2 мл осадка клеток). На этой стадии клетки должны заметно набухнуть.
4. Через 20 мин лизируйте клетки путем гомогенизации в гомогенизаторе Даунса восемью движениями пестика типа «В».
5. Добавьте 4-кратный по сравнению с клеточным осадком объем 50 мМ трис-HCl, pH 7,9, 10 мМ $MgCl_2$, 2 мМ ДТТ, 25%-ной (вес/объем) сахарозы и 50%-ного глицерола и осторожно перемешайте суспензию. Продолжая слегка потряхивать суспензию, добавьте по каплям насыщенный (нейтрализованный) раствор сульфата аммония в объеме, равном объему осадка клеток. После этого еще 30 мин осторожно перемешивайте этот лизат, обладающий высокой вязкостью. Перемешивайте очень осторожно, чтобы не допустить дробления ДНК; в противном случае будет трудно отделить ее на следующем этапе. После добавления приблизительно половины нужного объема сульфата аммония вязкость увеличится, что указывает на лизис ядер. Обычно лизаты очень вязки и гомогенны, но иногда они содержат комочки и не обладают высокой вязкостью. Мы получали активные экстракты из лизатов обоих типов, причем более стабильно — из лизатов первого типа. Доля активных экстрактов, приготовленных таким способом, составляет 80%.
6. Осторожно перелейте экстракт в поликарбонатные пробирки и центрифугируйте при 175 000 *g* 3 ч (например, в роторе Beckman 50.2 при 45 000 об/мин).
7. Слейте супернатант так, чтобы не повредить осадок (оставьте над ним 1—2 мл) и осадите белок и нуклеиновую кислоту добавлением сухого сульфата аммония (0,35 г/мл супернатанта). После того как сульфат аммония растворится, добавьте 1,0 мкл 1 М NaOH на 1 г сульфата аммония и размешивайте суспензию еще 30 мин.
8. Соберите осадок центрифугированием при 15 000 *g* 20 мин. Полностью слейте супернатант и ресуспендируйте осадок в растворе 40 мМ трис-HCl, pH 7,9, 0,1 М KCl, 10 мМ $MgCl_2$, 0,2 мМ ЭДТА, 2 мМ ДТТ, 15%-ного глицерола в объеме, равном 1/20 объема супернатанта после ультрацентрифугирования (п. 7).
9. Отдиализуйте суспензию дважды против буфера для ресуспендирования (50—100 объемов каждый раз) в течение 8—12 ч в общей сложности. Во время диализа объем раствора увеличивается на 30—50%.
10. Отцентрифугируйте отдиализованную суспензию при 10 000 *g* 10 мин, чтобы удалить нерастворимый материал. Окончательный супернатант разделите на маленькие порции (0,2—0,5 мл), быстро заморозьте их в жидком азоте или в сухом льду и храните при —70 °С. При этой температуре экстракт сохраняет полную активность при хранении минимум в течение года; его можно несколько раз подвергать оттаиванию и быстрому замораживанию без потери активности.

ками HeLa, которые легко получить в больших количествах. Экстракты этих клеток содержат относительно мало нуклеазной активности, проявляющейся во время инкубации при 30 °С. Подобные экстракты с транскрипционной активностью выделяли и из других клеточных линий. Как правило, культуры, выращенные в роллерных бутылях, дают активные экстракты. Однако большинство других клеточных линий и тканей дают экстракты с низким уровнем транскрипции или с большим количеством нуклеаз.

Подробности метода выделения экстрактов клеток HeLa приведены в табл. 1. Выход экстракта составляет приблизительно 2 мл из 1 л клеточной суспензии (этого количества экстракта достаточно для 100—400 проб), в нем содержится 15—30 мг/мл белка и до 2 мг/мл нуклеиновой кислоты (преимущественно рРНК). Экстракты должны быть сконцентрированы до такой степени, чтобы при добавлении в пробы их объем был минимальным, а конечная концентрация соли достаточно низкой (соль в высокой концентрации ингибирует транскрипцию; разд. 4.3.2). Попытки получения еще более концентрированных экстрактов путем растворения осадка в меньшем объеме после преципитации (табл. 1, п. 7) или путем тугого завязывания диализного мешка, чтобы предотвратить увеличение объема раствора во время диализа (табл. 1, п. 9), были не всегда успешными из-за повышенного выпадения в осадок белка во время диализа. Диализ против буфера с более низкими концентрациями солей также приводил к получению менее активных лизатов в результате повышения преципитации белка.

2.2. Реакция транскрипции

Аналитические реакции удобно проводить в микроцентрифужных пробирках одноразового использования в конечном объеме 25—50 мкл. В состав стандартной смеси (25 мкл) входят:

7,5 — 15,0 мкл бесклеточного экстракта
0,2—1,5 мкг ДНК-матрицы
по 50 мкМ ATP, GTP, CTP и UTP
4 мМ креатинфосфат
5 мкКи [^{32}P] GTP (~10 мКи/мл водного коммерческого препарата, >200 мКи/ммоль).

Обратите внимание, что все соли, необходимые для транскрипции, вносятся с самим экстрактом. Инкубацию проводят при 30 °С 30—120 мин.

При анализе РНК-транскриптов, инициируемых слабыми промоторами, в качестве меченого радиоактивного нуклеозидтрифосфата рекомендуется использовать GTP, поскольку при

этом сводится к минимуму ложное мечение других нуклеиновых кислот (разд. 3.2, п. 2). Однако в других случаях (например, см. разд. 4.1), возможно, лучшей меткой является радиоактивный UTP. Для равномерного мечения РНК-транскриптов необходим [α-^{32}P]-нуклеозидтрифосфат; если же метят только 5′-конец транскрипта, то следует использовать нуклеозидтрифосфат, меченный в β-положении. Метка в α-положении стабильна в бесклеточных экстрактах, тогда как метка в β- и γ-положениях может отщепляться благодаря различным киназным и фосфатазным активностям, имеющимся в экстракте. При этом не исключено значительное обменное мечение других нуклеозидтрифосфатов, и поэтому данные, полученные с трифосфатами, меченными в β- или γ-положениях, следует интерпретировать с осторожностью.

2.3. Выделение РНК

После определенного периода инкубации реакцию останавливают и выделяют РНК по методу, описанному в табл. 2. Хотя этот метод довольно трудоемкий, он всегда позволяет получить недеградированную РНК, свободную от примесей белка Раствор РНК, полученный этим методом, как правило, не содержит невключившихся нуклеозидтрифосфатов, поэтому количество ^{32}P в нуклеиновой кислоте можно определить, просто измеряя черенковское излучение.

Таблица 2. Выделение РНК после транскрипции

1. Для терминации реакции транскрипции (объем смеси 25—50 мкл) добавьте 250 мкл 7,5 М мочевины, 0,5%-ного ДСН, 10 мМ ЭДТА и 10 мМ трис-HCl, pH 8,0.
2. Добавьте равный объем (275—300 мкл) смеси фенол — хлороформ — изоамиловый спирт (20 : 20 : 1) и встряхивайте на вортексе 30 с. После центрифугирования в микроцентрифуге (Эппендорф) в течение 5 мин отберите водную фазу (первая водная фаза) и перенесите ее в чистую микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл, а органическую фазу и интерфазу оставьте.
3. Добавьте к органической фазе с интерфазой 150 мкл смеси, имеющей состав: 7 М мочевина, 0,35 М NaCl, 1%-ный ДСН, 10 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0, 25 мкг дрожжевой тРНК. Перемешайте на вортексе и затем отцентрифугируйте 20 с. В интерфазе образуется очень плотный осадок белка, из-за чего нельзя отобрать вторую водную фазу. Поэтому отберите органическую фазу пастеровской пипеткой и вновь проэкстрагируйте интерфазу вместе со второй водной фазой 200 мкл хлороформа. После кратковременного встряхивания и центрифугирования (20 с) вторую водную фазу отобрать легко.
4. Объедините первую и вторую водные фазы, объем которых составляет 0,45 мл. Добавьте равный объем смеси фенол — хлороформ — изоамиловый спирт и перемешайте встряхиванием. Отцентрифугируйте 5 мин на микроцентрифуге и затем отберите водную фазу, оставляя немного раствора над интерфазой.

5. Проведите экстракцию водной фазы еще два раза, каждый раз равным объемом хлороформа. После первой такой экстракции иногда виден небольшой липкий белковый осадок, который следует отбросить с органической фазой. После второй экстракции интерфаза должна быть совершенно чистой.
6. К водной фазе добавьте 1 мл этанола, перемешайте и затем оставьте смесь в спирте с сухим льдом на 5 мин или при —20 °С минимум на 2 ч.
7. Отцентрифугируйте пробу 5 мин в микроцентрифуге в холодной комнате и слейте супернатант.
8. Осадок ресуспендируйте в 200 мкл 0,2%-ного ДСН, добавьте 200 мкл 2 М ацетата аммония и затем осадите нуклеиновую кислоту, как описано в п. 6.
9. Повторите стадию п. 8.
10. Лиофилизуйте осажденную нуклеиновую кислоту, растворите ее в 60 мкл 0,2%-ного саркозила, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0 и храните при —20 °С.

3. Анализ продуктов транскрипции РНК-полимеразой II

3.1. Эксперименты с прерванной транскрипцией

РНК-полимераза II не терминирует транскрипцию in vitro. Однако в экспериментах с прерванной (run-off) транскрипцией образуются продукты РНК определенных размеров. В этих экспериментах в качестве матрицы используют молекулы ДНК, расщепленные рестриктирующим ферментом внутри транскрибируемой последовательности. РНК-полимеразы, которые транскрибируют такую ДНК, достигая ее конца, останавливаются или «соскакивают». Если значительное число молекул фермента инициируют транскрипцию в одном и том же сайте, то образуется популяция молекул РНК определенного размера. При электрофорезе такая популяция будет мигрировать в виде одной полосы. Если в качестве матриц в разных реакционных смесях использовать фрагменты ДНК, расщепленные различными ферментами рестрикции, путем сравнения размеров полученных РНК можно определить сайт начала транскрипции. Этот метод был широко использован в бесклеточных системах транскрипции для картирования эукариотических промоторов.

Размеры данного РНК-транскрипта можно просто и четко определить по методике Мак-Мастера и Кармикела [17], основными этапами которой являются денатурация РНК глиоксалем и последующий электрофорез в агарозном геле. Эта методика, подробно описанная в табл. 3, удобна для анализа РНК в широком диапазоне размеров, причем расстояние, пройденное РНК, и lg молекулярной массы (для РНК от 0,2 kb до 5 kb и более) связаны линейной зависимостью. В примере, приведенном на рис. 1, РНК были транскрибированы с рекомбинантных плазмид, содержащих поздний промотор аденовируса и

Таблица 3. Определение размеров РНК-транскриптов

1. Для приготовления раствора с глиоксалем смешайте:
   270 мкл диметилсульфоксида
   4,2 мкл, 1 М фосфата натрия, pH 6,8
   60 мкл деионизованного глиоксаля[1]
2. Присутствие большого количества рРНК в бесклеточном экстракте (разд. 2.1) ограничивает возможности электрофоретического анализа РНК, транскрибированной in vitro. Чтобы избежать перегрузки геля, обработку глиоксалем и электрофорез следует проводить только для одной четверти РНК, полученной в стандартной реакционной смеси объемом 25 мкл (разд. 2.2), т. е. для 15 мкл из 60 мкл экстрагированной РНК (табл. 1, п. 10).
   Смешайте:
   15 мкл РНК (в растворе 0,2%-ного саркозила, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0)
   27 мкл раствора с глиоксалем
   Инкубируйте при 50 °С 1 ч.
3. Приготовьте 1,4%-ный агарозный гель (длиной 20 см и толщиной 0,3 см) на 10 мМ фосфате натрия, pH 6,8. Этот же буфер залейте в камеру для электрофореза.
4. После добавления бромфенолового синего нанесите каждую пробу обработанной глиоксалем РНК в отдельную лунку (0,6×0,3 см) агарозного геля. В другую лунку в качестве маркеров нанесите предварительно обработанные глиоксалем РНК с подходящей молекулярной массой[2].
5. Проводите электрофорез при 120 В 2,5 ч, обеспечив быструю рециркуляцию форезного буфера в камере, чтобы избежать изменения pH. При этом напряжении получают оптимальные результаты; при более низком напряжении и, следовательно, более длительном электрофорезе образуются более диффузные полосы.
6. Окрасьте гель бромистым этидием, чтобы увидеть эндогенные рРНК и тРНК. При этом транскрибированная РНК не выявляется, так как ее слишком мало в пробе. Этот прием служит проверкой на присутствие в пробах РНК и на отсутствие ее деградации[3]. Перед окрашиванием бромистым этидием РНК должна быть освобождена от глиоксаля щелочью. Это делают с помощью следующей процедуры.
   Погрузите гель в десятикратный по объему раствор 50 мМ NaOH, 0,5 мкг/мл бромистого этидия на 20 мин. Перенесите гель в десятикратный по объему раствор 0,1 М трис-HCl, pH 7,5, 0,5 мкг/мл бромистого этидия на 40 мин. РНК можно увидеть благодаря ее флуоресценции при УФ-освещении (300—320 нм).
7. Высушите гель, пользуясь специальным прибором для сушки геля.
8. Экспонируйте высушенный гель с рентгеновской пленкой для выявления ^{32}Р-транскрибированной РНК.
9. Измерив расстояния, пройденные маркерами, постройте стандартную кривую зависимости пройденного расстояния от логарифма молекулярной массы и определите по ней молекулярные массы РНК-транскриптов.

---

[1] Деионизуйте глиоксаль (Eastman), встряхивая его 3 ч со смолой Amberlite (MB-1) (25 г/100 мл глиоксаля). Отфильтруйте глиоксаль от смолы и храните его порциями по 0,5 мл при —20 °С. Он стабилен по крайней мере 6 мес.

[2] Меченый ^{32}Р-РНК-маркер можно приготовить путем транскрипции in vitro ДНК-матрицы, содержащей известный промотор, например сильный поздний промотор аденовируса 2. Из такой ДНК с помощью различных эндонуклеаз рестрикции легко выделить фрагменты, с которых считываются прерванные РНК известного размера. После обработки глиоксалем такие маркеры сохраняют стабильность до двух месяцев.

[3] Деградацию РНК, происходящую во время электрофореза, можно устранить, проводя электрофорез в присутствии ДСН. Для этого добавьте ДСН в буфер для электрофореза до конечной концентрации 0,1% и проведите предварительный электрофорез при 150 В в течение 45 мин.

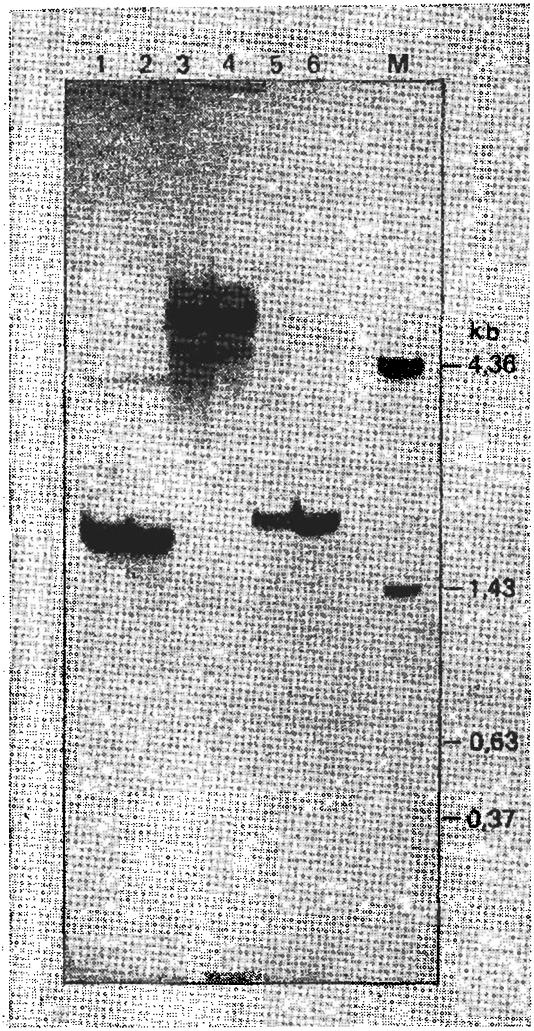


Рис. 1. Анализ продуктов прерванной транскрипции с помощью глиоксалирования и электрофореза в агарозном геле. Сконструированные плазмиды (Jove, Manley, неопубликованные данные), содержащие поздний промотор аденовируса 2 и различные участки поздней транскрипционной единицы, были обработаны рестриктазой и использованы в качестве матрицы для транскрипции in vitro. ДНК были рестрицированы так, чтобы образовались прерванные транскрипты с размерами 1,8 kb (дорожки 1 и 2), 7,0 kb (дорожки 3 и 4) и 1,95 kb (дорожки 5 и 6). Маркеры молекулярной массы (дорожка М) также получены при транскрипции in vitro.

различные участки длинной (30 kb) единицы поздней транскрипции. Очевидно, в бесклеточном экстракте возможен синтез очень длинных РНК вплоть до 7—8 kb, что является пределом. Хотя известно, что рекомбинантные плазмиды кодируют сигналы процессинга РНК, в бесклеточном экстракте в условиях, описанных в разд. 2.2, это показать не удалось.

Скорость элонгации РНК-полимеразой II в реакционной смеси составляет ~300 нуклеотидов/мин. Подобная скорость in vivo в 10 раз выше, что частично может быть связано с бо-

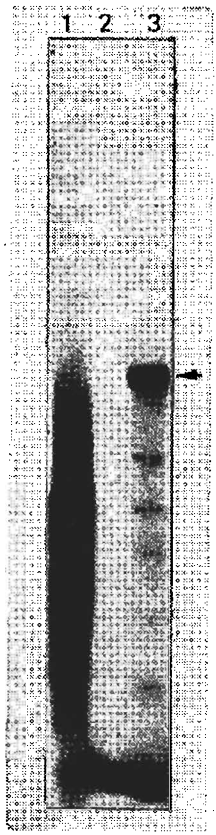


Рис. 2. Чувствительность к α-аманитину транскрипции с позднего промотора аденовируса 2. РНК была синтезирована в реакционных смесях (по 100 мкл), каждая из которых содержала 400 мкКи [α-^{32}P]-UTP (разд. 2.2). В качестве матрицы использовали фрагмент (*Bal*I-EpBR322), который представляет собой *Bal*I-фрагмент ДНК аденовируса серотипа 2, встроенный в плазмиду pBR322; этот участок ДНК содержит поздний промотор аденовируса 2, с которого транскрибируется специфическая РНК из 1750 нуклеотидов (показано стрелкой). После инкубации РНК была выделена, обработана глиоксалем и проанализирована методом электрофореза в геле (на анализ израсходован 1% РНК; разд. 3.1). Реакционная смесь, проанализированная на дорожке 1, содержала 5 мкл бесклеточного экстракта; на дорожке 2 смесь содержала 30 мкл экстракта плюс α-аманитин (0,5 мкг/мл); на дорожке 3 смесь содержала 30 мкл экстракта.

лее высокой температурой in vivo (37 °С) по сравнению с условиями реакции in vitro (30 °С). Скорость накопления прерванных транскриптов in vitro приблизительно линейна в течение часа [5].

РНК-полимераза II предпочтительно инициирует транскрипцию на концах фрагментов ДНК и в местах внутренних одноцепочечных разрывов [18]. Этот фермент способен также метить концы фрагментов ДНК, присоединяя к ним [α-^{32}P]-NTP и давая полноразмерные меченые молекулы, устойчивые к расщеплению РНКазой. Каждая из катализируемых им реакций чувствительна к α-аманитину (0,5 мкг/мл). Вместе с тем в некоторых препаратах экстракта обнаружена активность, отвечающая за концевое мечение и устойчивая к α-аманитину.

Бесклеточный экстракт содержит много растворимых белков клетки. Хотя большинство из них для нашей цели не имеют значения, некоторые могут оказаться помехой в определенных

опытах. Например, экстракты, как правило, содержат большое количество топоизомераз I и II типов, а также ДНК-лигазу. В связи с этим в реакционной смеси может быстро меняться топология ДНК-матрицы, что мешает, к примеру, исследованиям сверхспиральной ДНК. Экстракт содержит также РНК-полимеразы I и III [16]. Их вклад в транскрипцию можно оценить по степени ингибирования α-аманитином. Прерванная транскрипция РНК-полимеразой II полностью ингибируется в присутствии 0,5 мкг/мл α-аманитина (рис. 2), в то время как транскрипция РНК-полимеразой I устойчива к α-аманитину, а РНК-полимераза II ингибируется только при концентрации α-аманитина 200 мкг/мл. В действительности большинство матричных ДНК не содержит промоторов для этих ферментов, и поэтому их присутствие несущественно для включения нуклеотидов. Однако в некоторых геномных клонах встречаются повторяющиеся элементы, которые содержат промоторы РНК-полимеразы III (см., например, [19]).

3.2. Ограничения

Анализ прерванных транскриптов, описанный в разд. 3.1, представляет собой простой, чувствительный и точный метод определения места начала транскрипции РНК, синтезируемых в бесклеточном экстракте. Однако он имеет определенные ограничения.

1. Бесклеточный экстракт содержит относительно высокие уровни нуклеиновой кислоты. Поскольку в основном это 18S- и 28S-рРНК, невозможно проанализировать более 25—50% РНК, содержащейся в 25 мкл реакционной смеси, так как при нанесении всей смеси на одну дорожку геля стандартного размера в области этих РНК будет сильная перегрузка.

2. Специфические транскрипты, считываемые с очень слабых промоторов, иногда трудно обнаружить из-за неспецифической инициации или терминации или из-за присутствия экзогенных нуклеиновых кислот (в частности, ДНК и рРНК и продуктов их распада), меченных по концам соответствующими ферментами, присутствующими в экстракте. Эти ферменты не чувствительны ни к α-аманитину, ни к актиномицину D, благодаря чему катализируемый ими синтез можно отличить от синтеза РНК de novo. Использование в качестве метки GTP приводит к минимальному концевому мечению, а UTP — к максимальному, в то время как меченые CTP и ATP дают высокие уровни радиоактивности тРНК, которая метится ферментами, катализирующими обмен нуклеотидов на ее 3′-конце (CCA).

3. Используя обычный метод прерванной транскрипции, денатурации глиоксалем и определения размеров путем элект-

рофореза в агарозном геле, можно картировать сайты инициации РНК-транскриптов с точностью только до 20 нуклеотидов. Чтобы картировать 5′-концы РНК более точно, короткие прерванные транскрипты анализируют в полиакриламидном секвенирующем геле. Структуру 5′-конца РНК, синтезированной в бесклеточном экстракте, можно исследовать методом «отпечатков пальцев» (фингерпринтирования) [2, 5], однако этот подход используется нечасто.

3.3. Анализ с помощью гибридизации и расщепления нуклеазой S1

Проблему неспецифического мечения РНК, возникающую иногда при применении основного метода (разд. 3.2; п. 2), можно решить с помощью гибридизации ^{32}P-РНК-транскриптов со специфической нерадиоактивной ДНК-зондом и последующей обработки нуклеазой S1, поскольку РНК, не комплементарная ДНК-зонду, разрушается этой нуклеазой. Первый этап

Таблица 4. Удаление ДНК из препаратов РНК-транскриптов

1. Растворите нуклеиновую кислоту, полученную на стадии 9 табл. 2, в 0,2 М ацетате аммония и затем осадите ее этанолом, как указано в пп. 6 и 7 табл. 2. Лиофилизуйте препарат.
2. Ресуспендируйте высушенный осадок в 100 мкл 10 мМ трис-HCl, pH 7,5, 0,1 М NaCl.
3. Добавьте ДНКазу, не содержащую РНКазы (если необходимо, обработанную йодацетатом [20]), до концентрации 50 мкг/мл и $MgCl_2$ до конечной концентрации 10 мМ.
4. Проинкубируйте 5 мин при 37 °С.
5. Добавьте 100 мкл 10 мМ ЭДТА, pH 8,0, 0,2%-ного ДСН.
6. Проэкстрагируйте пробу равным объемом смеси фенол — хлороформ — изоамиловый спирт (20 : 20 : 1) и вновь экстрагируйте водную фазу равным объемом хлороформа, как указано в пп. 4 и 5 табл. 2.
7. Добавьте NaCl до конечной концентрации 0,15 М и 2 объема этанола. Осадите РНК, инкубируя смесь в спирте с сухим льдом 5 мин (или по крайней мере 2 ч при —20 °С).
8. Отцентрифугируйте РНК в микроцентрифуге 5 мин в холодной комнате (4 °С).
9. Ресуспендируйте осадок РНК в 60 мкл 0,2%-ного саркозила, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0 и храните при —20 °С.

этого анализа заключается в удалении ДНК из неочищенного препарата РНК, выделенной после транскрипции в бесклеточном экстракте, в противном случае ДНК будет мешать реакции гибридизации. ДНК удаляют методом, описанным в табл. 4. Затем, следуя табл. 5, проводят гибридизацию и расщепление нуклеазой S1. Двухцепочечную ДНК обычно прямо используют в качестве ДНК-зонда без предварительной очистки цепи ДНК, комплементарной изучаемой РНК.

Таблица 5. Анализ ^{32}P-РНК-транскриптов с помощью гибридизации и расщепления нуклеазой S1[1]

1. Для анализа РНК-транскриптов, образующихся в результате одной стандартной реакции транскрипции, обычно используют 0,25 мкг ДНК-зонда размером ~5 kb. Для фрагментов РНК, бо́льших по размерам, берут пропорционально бо́льшие, а для меньших — соответственно меньшие количества ДНК. Такое количество ДНК избыточно по сравнению с малым количеством РНК, синтезированной в стандартной реакции транскрипции, и в то же время оно достаточно для проведения реакции гибридизации до конца в течение короткого периода времени. Добавьте в микроцентрифужную пробирку, содержащую 100 мкл 0,2 М ацетата натрия, pH 5,2, 0,1% ДСН, ДНК-зонд и ^{32}P-РНК (без примесей ДНК; табл. 4). К этой смеси добавьте 2,5 объема этанола, перемешайте и оставьте в спирте с сухим льдом на 5 мин (или при —20 °С минимум на 2 ч), чтобы нуклеиновые кислоты выпали в осадок.
2. Отцентрифугируйте осадок нуклеиновых кислот 5 мин на микроцентрифуге в холодной комнате (4 °С). Осторожно слейте этанол и затем дайте осадку высохнуть на воздухе в течение приблизительно 10 мин. Важно не пересушить осадок, иначе его будет трудно растворить.
3. Ресуспендируйте пробу в 15 мкл буфера для гибридизации (80%-ный деионизованный формамид[2], 0,4 М NaCl, 1 мМ ЭДТА, 40 мМ PIPES, pH 6,5).
4. Денатурируйте ДНК-зонд прогреванием при 68 °С 10 мин и затем быстро перенесите пробирку в баню на 60 °С. Инкубируйте 45 мин при данной температуре; в течение этого времени происходит гибридизация[3].
5. После гибридизации быстро разбавьте реакционную смесь 200 мкл охлажденной во льду смеси с нуклеазой S1 [0,25 М NaCl, 1 мМ $ZnSO_4$, 5%-ный глицерол, 30 мМ ацетат натрия, pH 4,5, $2 \cdot 10^3$ ед./мл нуклеазы S1 (Boehringer)]. Когда анализируют сразу несколько проб, их по одной снимают с инкубации при 60 °С, разбавляют смесью с нуклеазой S1 и перемешивают. Такая обработка предотвращает реассоциацию ДНК — ДНК и возможное вытеснение гибридизовавшейся РНК.
6. Инкубируйте каждую пробу при 45 °С 30 мин; во время этой инкубации происходит расщепление нуклеазой S1.
7. После расщепления добавьте в каждую пробу 0,2 мл смеси фенол — хлороформ (1 : 1, по объему) и затем 10 мкг тРНК-носителя. Смеси перемешайте и отцентрифугируйте на микроцентрифуге 30 с.
8. После центрифугирования перенесите водную (верхнюю) фазу в чистую микроцентрифужную пробирку и осадите нуклеиновые кислоты 0,5 мл этанола, инкубируя пробы в спирте с сухим льдом 5 мин (или минимум 2 ч при —20 °С).
9. Отцентрифугируйте осадок нуклеиновых кислот на микроцентрифуге 5 мин в холодной комнате (4 °С).
10. Высушите каждый осадок и растворите его в 15—60 мкл 1 мМ ЭДТА, 0,2%-ного саркозила. При необходимости пробы храните при —20 °С.
11. Всю пробу или ее часть можно обработать глиоксалем и защищенные от нуклеазы фрагменты РНК проанализировать с помощью электрофореза в агарозном геле, как описано в табл. 3.

[1] Основано на методе Берке и Шарпа [21].

[2] Деионизуйте формамид, встряхивая его со смолой Amberlite MB-3 (5 г на 100 мл формамида) при комнатной температуре минимум 30 мин. Удалите смолу фильтрованием и храните формамид при —20 °С. Приготовленный таким образом формамид в этих условиях остается стабильным минимум 6 мес.

[3] Здесь приведены время и температура гибридизации для ДНК аденовируса 2. Соответствующие условия для других зондов можно определить по Берку и Шарпу [21].

Для определения точки начала транскрипции in vitro с помощью нуклеазы S1 ДНК-зондом должен служить фрагмент рестрикции геномной ДНК, один конец которого соответствует внутренней области гена, а другой — участку ДНК перед предполагаемым сайтом инициации. Обычно после гибридизации и расщепления нуклеазой S1 РНК-транскрипты обрабатывают глиоксалем и затем определяют их размеры путем электрофореза в агарозном геле (табл. 5, п. 11). Лучшее разрешение получают при использовании меченой радиоактивной ДНК-зонда и немеченных РНК-транскриптов (как описано в гл. 5, разд. 5), поскольку иногда легче получить соответствующие маркерные ДНК, чем маркерные РНК (молекулы ДНК и РНК с одинаковой длиной цепи мигрируют не абсолютно одинаково). Тем не менее использование меченых радиоактивных РНК-транскриптов и немеченой ДНК-зонда, описанное в табл. 5, имеет два преимущества. Во-первых, синтезировать радиоактивную РНК in vitro так же легко, как немеченую РНК, и, таким образом, убирается дополнительный этап мечения. Во-вторых, в некоторых случаях желательно анализировать непосредственно РНК-транскрипт. Например, если РНК-продукт, образующийся в системе in vitro, присутствует в бесклеточном экстракте и в виде эндогенной мРНК, то необходимо анализировать меченую радиоактивную РНК.

4. Оптимизация транскрипционной активности РНК-полимеразы II

4.1. Подбор концентраций ДНК и экстракта

Зависимость транскрипции и от концентрации ДНК, и от концентрации экстракта не линейна. При измерении уровня прерванной транскрипции как функции концентрации ДНК при постоянной концентрации экстракта выявляется следующее. Во-первых, существует пороговая концентрация ДНК, ниже которой транскрипция отсутствует, и, во-вторых, ДНК в высоких концентрациях ингибирует процесс транскрипции [5]. Чтобы обеспечить минимальную (пороговую) концентрацию ДНК, необходимую для транскрипции, можно использовать ДНК-носитель, отличающуюся от ДНК, которая должна быть транскрибирована. Так, например, промотор-специфическая ДНК, присутствующая в концентрации ниже пороговой, активно транскрибируется в присутствии ДНК pBR322 или *E. coli*. ДНК-носителем могут служить и синтетические дуплексы, представляющие собой чередующиеся сополимеры poly(dIC : dIC) и poly(dAT : dAT). Это указывает на то, что потребность в массе ДНК не связана с потребностью в специфических последовательностях [22]. Преимущества использования таких сопо-

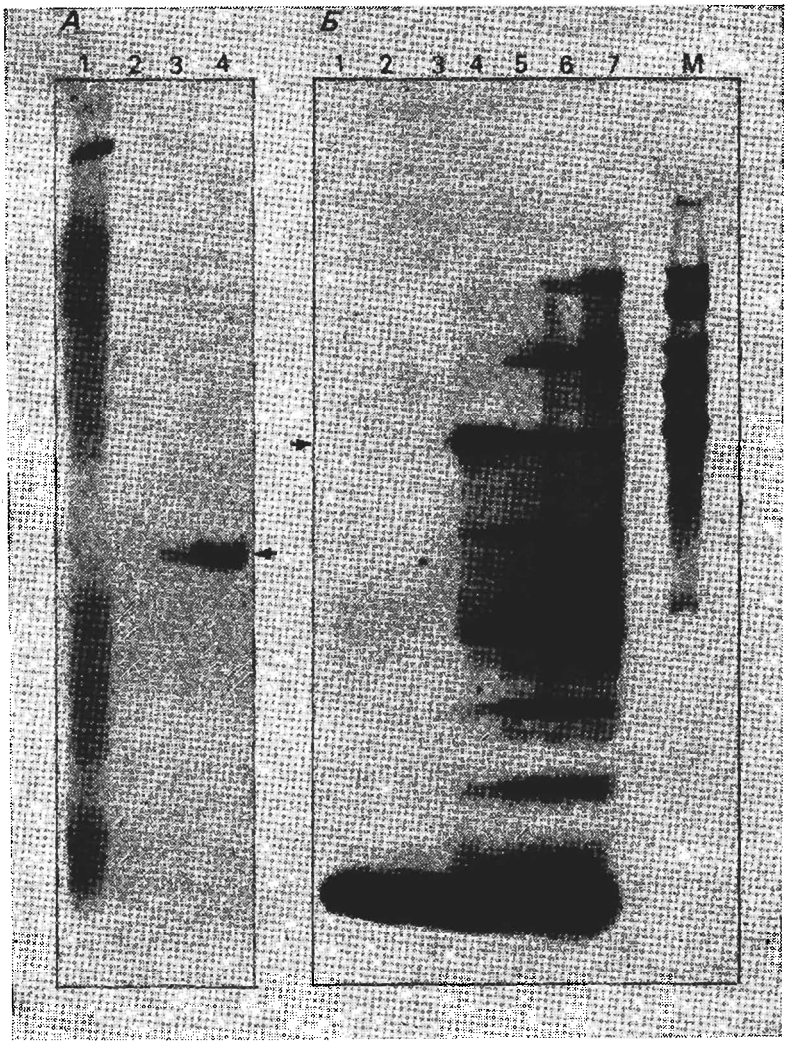


Рис. 3. Определение оптимальных концентраций экстракта и ДНК, необходимых для точной транскрипции. РНК была синтезирована в стандартных реакционных смесях с использованием [α-^{32}P]-UTP (разд. 2.2), где варьировали только концентрацию бесклеточного экстракта (*А*) или ДНК (*Б*). ДНК-матрицей служил фрагмент *Ball*-E-pBR322 (см. подпись к рис. 2). Положения специфического транскрипта (1750 нуклеотидов) указаны стрелками. В реакциях, представленных на рис. 3, *А*, количество использованного бесклеточного экстракта на дорожках 1—4 было 2,5 мкл, 5,0 мкл, 10,0 мкл и 15,0 мкл соответственно при концентрации ДНК 50 мкг/мл. На рис. 3, *Б* использованные концентрации ДНК на дорожках 1—7 были (мкг/мл) : 0 12,5; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0 и 125,0 соответственно. На дорожку *М* в качестве маркера молекулярной массы наносили *Eco*RI-гидролизат ДНК аденовируса 2 после мечения путем ник-трансляции.

лимеров в роли ДНК-носителя заключаются в том, что РНК-продукты, транскрибированные на poly(dIC : dIC) и poly(dAT : : dAT), содержат только два нуклеотида. Следовательно, если в реакции с poly(dIC : dIC) участвует [α-^{32}P]-UTP, то исключается образование радиоактивного фонового продукта в результате неспецифического считывания с носителем. Важнейшим моментом в понимании зависимости транскрипции от массы ДНК является тот факт, что при фиксированной концентрации суммарной ДНК молярный выход транскриптов в расчете на промотор является постоянным и не зависит от источника ДНК-носителя.

Наблюдается также критическая зависимость транскрипции от концентрации экстракта [5]. В действительности зависимость от концентрации ДНК и от концентрации белка в экстракте связаны между собой [23]. Специфическую транскрипцию регистрируют при конечной концентрации белка экстракта в реакционной смеси в пределах 4—18 мг/мл. При низких значениях этого диапазона пороговая концентрация ДНК ниже и процесс транскрипции становится менее зависимым от абсолютной концентрации ДНК. Оптимум концентрации ДНК приблизительно равен 10 мкг/мл. При более высоких концентрациях экстракта пороговая концентрация ДНК настолько увеличивается, что в некоторых случаях, чтобы зарегистрировать какую-либо транскрипцию, приходится доводить концентрацию ДНК до 60 мкг/мл. В этих условиях транскрипция становится более зависимой от абсолютной концентрации ДНК. Чтобы найти оптимальные условия, для каждого нового экстракта нужно тщательно подбирать концентрации ДНК и экстракта. Типичный пример такого подбора показан на рис. 3. При очень низких концентрациях экстракта может наблюдаться высокий уровень неспецифической транскрипции (ср. дорожки 1 и 4 на рис. 3, *А*). Вероятно, это связано с тем, что в данных условиях лимитирован необходимый фактор специфичности. При высоких концентрациях ДНК уровень специфической инициации снижается и образуются транскрипты, размер которых больше и меньше по сравнению с промотор-специфическим транскриптом (показано стрелкой; ср. дорожки 4—7 на рис. 3, *Б*). Транскрипты бóльшего размера образуются в результате транскрипции линейной ДНК-матрицы, участки которой соединены конец-в-конец, а происхождение транскриптов меньшего размера не известно [5].

4.2. Различия между экстрактами

Транскрипционная активность экстрактов, выделенных из разных клеточных препаратов, различается в 5—10 раз, причем две трети экстрактов обладают активностью, не более чем

вдвое отличающейся от максимальной. Активность экстрактов необходимо сравнивать, пользуясь системой прерванного синтеза, содержащей стандартный промотор полимеразы II, например главный поздний промотор аденовируса 2. При оптимальных концентрациях ДНК и экстракта (разд. 4.1) и удельной радиоактивности [α-^{32}P]-UTP 100 Ки/ммоль хороший экстракт (в объеме 25 мкл) даст включение 10^6 расп/мин за 1 ч, что эквивалентно синтезу 20 нг прерванного транскрипта размером 2200 нуклеотидов, инициированного с позднего промотора аденовируса 2. Это означает синтез одной молекулы РНК на 10 молекул имеющейся ДНК-матрицы, хотя в действительности в экстракте может использоваться только часть имеющихся матриц, на которых многократно проходят циклы инициации.

4.3. Условия реакции

4.3.1. Температура

Одна из характерных особенностей процесса транскрипции в системе бесклеточного экстракта заключается в его необычной, неаррениусовской зависимости от температуры. Как правило, транскрипцию проводят при 30 °С, и синтезированная РНК остается стабильной минимум 8 ч. С повышением температуры до 37 °С значительно увеличивается скорость деградации РНК. Так, РНК, синтезированная при 30 °С, при 37 °С деградирует в течение 10 мин. Транскрипция, происходящая при 25 °С, дает ожидаемый эффект Аррениуса.

4.3.2. Ионный состав

Специфическая транскрипция в бесклеточном экстракте очень чувствительна к ионной силе. KCl или NaCl в концентрации выше 60 мМ значительно ингибируют реакцию, а при концентрации этих солей 120 мМ и выше специфическая транскрипция практически прекращается. Реакция идет в присутствии 15—30 мМ $(NH_4)_2SO_4$. Дивалентные катионы Zn^{2+}, Ca^{2+} или Mn^{2+} ингибируют транскрипцию. Чтобы предотвратить возможное ингибирование примесями тяжелых металлов, обычно в реакционную смесь добавляют ЭДТА до конечной концентрации 0,2 мМ.

4.3.3. pH

Реакции транскрипции обычно проводят при pH 7,9, что является оптимальным для очищенной РНК-полимеразы II [1]. Однако для специфической транскрипции этим ферментом в бесклеточной системе резко выраженный оптимум pH не обнаружен.

4.3.4. Нуклеотиды

Даже после тщательно проведенного диализа большинство бесклеточных экстрактов, по-видимому, содержат свободные нуклеотиды (около 1 мкМ) [23]. Обычно для восстановления содержания нуклеозидтрифосфатов в реакционную смесь добавляют 4 мМ креатинфосфат, что позволяет снизить концентрации трифосфатов и, следовательно, увеличить удельную радиоактивность добавляемого радиоактивного нуклеотида. В присутствии креатинфосфата концентрации UTP, CTP и GTP, равные 5 мкМ, являются насыщающими для специфической транскрипции, причем более высокие концентрации (до 500 мкМ) не ингибируют ее [24]. Благодаря эндогенному пулу реакция транскрипции не абсолютно зависит от добавления этих трех нуклеотидов. Для оптимальной активности необходима более высокая концентрация ATP (50 мкМ), но концентрации ATP свыше 200 мкМ ингибируют реакцию [23].

5. Посттранскрипционный процессинг молекул — предшественников мРНК

5.1. Кэпирование и метилирование

Отдиализованный бесклеточный экстракт содержит достаточное количество S-аденозилметионина для метилирования 5′-концов предшественников мРНК, синтезируемых РНК-полимеразой II [5]. Новосинтезированная РНК быстро и количественно кэпируется с образованием структуры типа кэп I [m^7GpppX(m)pY], тогда как структуры типа кэп II [m^7GpppX(m)pY(m)pZ] не обнаружены [25]. Внутреннее метилирование пока не изучалось. Экзогенный S-аденозилметионин не влияет на процесс транскрипций [17, 26], а S-аденозилгомоцистеин ингибирует инициацию специфической транскрипции РНК-полимеразой II [26].

5.2. Сплайсинг

В бесклеточных лизатах, подобных (или идентичных) системе, описанной в этой главе, сплайсинг мРНК наблюдали только на низком уровне, причем результаты этих наблюдений воспроизвести не удалось [12—14]. Однако исследования в этом направлении продолжают расширяться, и ситуация, по-видимому, разъяснится в ближайшем будущем.

5.3. Полиаденилирование

В результате транскрипции экзогенной ДНК в бесклеточных экстрактах в условиях, описанных в разд. 2.2, синтезируются молекулы РНК, не полиаденилированные на заметном

уровне. Однако в последнее время найдены условия, позволяющие эффективно, точно и специфически полиаденилировать экзогенные предшественники мРНК в бесклеточном экстракте, полученном из клеток HeLa [11]. Предшественники мРНК синтезируют на линейных ДНК-матрицах при стандартных условиях реакции (разд. 2.2) и затем очищают по методу, приведенному выше (табл. 2). 60 мкл РНК, полученной в стандартной реакции транскрипции (табл. 2, п. 10), осаждают этанолом, лиофилизуют и растворяют в 50 мкл стерильной дистиллированной воды, причем удалять примеси ДНК из этого раствора не обязательно. Затем РНК инкубируют во второй пробе свежего бесклеточного экстракта в условиях полиаденилирования. В состав стандартной смеси для реакции полиаденилирования (объем 25 мкл) входят:

5 мкл бесклеточного экстракта
10 мкл РНК-транскриптов
0,1—0,5 мМ АТР
4,0 мМ креатинфосфат
0,5 мМ ЭДТА.

Каждую реакционную смесь инкубируют при 30 °С 60 мин и затем выделяют РНК обычным методом (табл. 2). Уровень полиаденилирования РНК определяют или методом аффинной хроматографии РНК на oligo(dT)-целлюлозе [27], или с помощью электрофореза в геле после обработки глиоксалем (табл. 3).

На рис. 4 изображен пример определения уровня полиаденилирования РНК, синтезированной in vitro, с помощью электрофореза. В качестве матрицы первоначально была использована рекомбинантная плазмида, которая содержала поздний промотор аденовируса 2 и последовательности SV40, кодирующие Т-антиген. ДНК была разрезана эндонуклеазой *Bam*H1 в районе, расположенном на 45 bp после сайта добавления poly(A), используемого in vivo. Длина добавленного poly(A)-фрагмента (дорожка 2) составляла 150—300 нуклеотидов.

Условия, необходимые для полиаденилирования в бесклеточном экстракте, должны точно соблюдаться так же, как и условия, необходимые для инициации специфической транскрипции, хотя в этих двух случаях условия совершенно различны. Например, полиаденилирование резко ингибируется при концентрациях моновалентных катионов выше 30 мМ, а двухвалентных катионов выше 4 мМ. Для него необходима также некая минимальная концентрация РНК. Как и в случае инициации транскрипции, потребность в РНК — это, по-видимому, потребность в общей массе РНК, а не в специфических последовательностях РНК. Таким образом, приступая к изучению полиаденилирования пре-мРНК in vitro, нужно подобрать кон-

Рис. 4. Характеристика прерванных РНК-транскриптов после полиаденилирования. Прерванные РНК-транскрипты были синтезированы в системе с бесклеточным экстрактом на *Bam*HI-фрагменте ДНК рφ 4-SVA, после чего они были очищены и добавлены в смесь для полиаденилирования, как описано в тексте. После экстракции и обработки глиоксалем РНК была проанализирована методом электрофореза в 1,2%-ном агарозном геле. Дорожка 1 — прерванные РНК-транскрипты перед полиаденилированием; дорожка 2 — РНК, проинкубированная в полиаденилирующей реакционной смеси, как описано в тексте; дорожка 3 — РНК, проинкубированная в полиаденилирующей реакционной смеси без АТР; дорожка 4 — РНК, проинкубированная в полиаденилирующей реакционной смеси без экстракта, но с добавлением соответствующего объема буфера для диализа; дорожка 5 — то же, что и дорожка 2, но с уменьшенным на 50% количеством добавленной РНК; дорожка 6 — то же, что и дорожка 3, но количество добавленной РНК уменьшено на 80%. На дорожках 1—4 количество проанализированной РНК было эквивалентно 20%, на дорожке 5—40% и на дорожке 6—100% содержания РНК в полиаденилирующей реакционной смеси.

центрации экстракта и РНК, оптимальные для проведения реакции; при этом полезно использовать приведенные выше значения как ориентировочные. При оптимальных условиях полиаденилируется более 70% молекул-предшественников, а размеры добавляемого poly(A)-фрагмента, так же как и in vivo, составляют 150—300 нуклеотидов. Реакция элонгации, по-видимому, идет непрерывно, и скорость элонгации относительно велика. При субоптимальных условиях уменьшаются и доля полиаденилируемой РНК-предшественника, и размеры добавляемого poly(A)-фрагмента.

Реакция полиаденилирования in vitro обладает поразительной специфичностью: эффективно полиаденилируется только тот предшественник мРНК, синтезированный in vitro, 3′-конец которого расположен рядом с аутентичным сайтом добавления poly(A) in vivo[1]. Таким образом в исследованиях реакции полиаденилирования полезно предварительно определять, способны ли быть субстратами в этой реакции молекулы РНК, которые были синтезированы на ДНК-матрицах, разрезанных различными рестриктазами. Приведенные выше результаты противоположны данным, полученным при использовании в реакции полиаденилирования очищенных poly(A)-полимераз. В последнем случае не обнаружена специфичность в выборе затравки, эффективность реакции невелика и размеры добавляемого poly(A)-фрагмента не регулируются (обзор см. [28]).

6. Транскрипция в бесклеточных экстрактах при участии РНК-полимераз I и III

Бесклеточные экстракты содержат значительные количества РНК-полимеразы I (R. Tjian, личное сообщение) и РНК-полимеразы III [19]. Ионные условия, необходимые для функционирования этих двух полимераз, могут отличаться от условий, необходимых для РНК-полимеразы II, и поэтому для определения оптимальных концентраций солей, ДНК и экстракта нужны предварительные исследования. РНК-полимеразы I и III, по-видимому, транскрибируют экзогенные ДНК-матрицы значительно более эффективно, чем это делает РНК-полимераза II. Каждая матрица транскрибируется первыми двумя ферментами за время обычной инкубации 1—10 раз, что в 10—100 раз эффективнее, чем в случае транскрипции РНК-полимеразой II (разд. 4.2). В отличие от РНК-полимераз II и III РНК-полиме-

[1] Специфическую эндонуклеазную активность, катализирующую in vivo образование 3′-концов мРНК для полиаденилирования (обзор см. [15]), in vitro обнаружить не удалось; остатки AMP присоединяются прямо к концу РНК, образующейся при прерванной транскрипции.

раза I, по-видимому, обладает видоспецифичностью; РНК-полимераза I, содержащаяся в бесклеточных экстрактах из клеток HeLa, транскрибирует гены рРНК человека, но не транскрибирует гены рРНК мыши [9].

Поскольку РНК-полимераза III в отличие от РНК-полимеразы II терминирует транскрипцию in vitro и поскольку размеры образующихся при этом РНК обычно относительно невелики (см., однако, ссылку [19]), продукты транскрипции РНК-полимеразой III можно анализировать непосредственно. Следовательно, в данном случае, как правило, нет нужды в прерванной транскрипции и S1-нуклеазном картировании. Напротив, поскольку на генах рРНК образуются большие транскрипты, для анализа транскрипции РНК-полимеразой I необходимы и прерванная транскрипция, и S1-нуклеазное картирование.

Наконец, бесклеточные экстракты из целых клеток, по крайней мере приготовленные из клеток HeLa, содержат, по-видимому, большую часть или почти все ферменты, участвующие в процессинге молекул — предшественников тРНК [8], и по крайней мере один из ферментов, необходимых для процессинга молекул — предшественников рРНК [9, 10].

Благодарности

Я благодарен Р. Джоув за предоставление данных эксперимента, приведенного на рис. 1. Работа, выполненная в нашей лаборатории, была субсидирована NIH grant GM-28983.

Литература

1. *Roeder R. G.* In: RNA Polymerase, Losick R. and Chamberlin M. (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. 285, 1976.
2. *Weil P. A., Luse D. S., Segall J., Roeder R. G.* Cell, **18**, 469 (1979).
3. *Grummt I.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 727 (1981).
4. *Wu G.-J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 2175 (1978).
5. *Manley J. L., Fire A., Cano A., Sharp P. A., Gefter M. L.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 3855 (1980).
6. *Tsujimoto Y., Hirose S., Tsuda M., Suzuki Y.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 4838 (1981).
7. *Wasylyk B., Kedinger C., Gorden J., Brison O., Chambon P.* Nature, **285**, 366 (1980).
8. *Standring D. N., Venegas A., Rutter W. G.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 5963 (1981).
9. *Grummt I., Roth E., Paule M. R.* Nature, **296**, 173 (1982).
10. *Miller K. G., Sollner-Webb B.* Cell, **27**, 165 (1981).
11. *Manley J. L.* Cell, **33**, 595 (1983).
12. *Weingartner B., Keller W.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4092 (1981).
13. *Goldenberg C. J., Raskas H. J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 5430 (1981).
14. *Kole R., Weissman S. M.* Nucleic Acids Res., **10**, 5429 (1982).
15. *Manley J. L.* Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., **30**, (1983), in press.

16. *Sugden B., Keller W.* J. Biol. Chem., **248**, 3777 (1973).
17. *McMaster G. K., Carmichael G. C.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 4835 (1977).
18. *Lewis M. K., Burgess R. R.* J. Biol. Chem., **255**, 4928 (1980).
19. *Manley J. L., Colozzo M. T.* Nature, **300**, 376 (1982).
20. *Zimmerman S. B., Sandeen G.* Anal. Biochem., **14**, 269 (1966).
21. *Berk A. J., Sharp P. A.* Cell, **12**, 721 (1977).
22. *Hansen U., Tenen D. J., Livingston D. M., Sharp P. A.* Cell, **27**, 603 (1981).
23. *Fire A., Baker C. C., Manley J. L., Ziff E. B., Sharp P. A.* J. Virol., **40**, 703 (1981).
24. *Handa H., Kaufman R. J., Manley J. L., Gefter M. L., Sharp P. A.* J. Biol. Chem., **256**, 478 (1981).
25. *Jove R., Manley J. L.* J. Biol. Chem., **259**, 8513 (1984).
26. *Jove R., Manley J. L.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 5842 (1982).
27. *Manley J. L., Sharp P. A., Gefter M. L.* J. Mol. Biol., **135**, 171 (1979).
28. *Edmonds M., Winters M. A.* Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., **17**, 149 (1976).

ГЛАВА 4

ТРАНСКРИПЦИЯ РНК В ИЗОЛИРОВАННЫХ ЯДРАХ

У. Марзлаф и Р. Хуан

1. Введение

Прежде чем исследовать механизм транскрипции специфических генов и процессинга первичных транскриптов в эукариотических клетках необходимо иметь адекватные системы транскрипции in vitro. Для их создания было использовано два основных подхода. При первом подходе в систему добавляют изолированные ядра, т. е. матрицей для транскрипции служит эндогенный хроматин. При втором подходе матрицами служат специфические клонированные фрагменты ДНК. В первом случае основной упор делают на сохранении in vitro клеточных активностей, а во втором усилия концентрируют вокруг определения последовательностей ДНК и белковых факторов, необходимых для точной экспрессии клонированных генов в данной пробе. Оба подхода имеют свои преимущества, и для понимания разных аспектов биосинтеза РНК их нужно рассматривать совместно. Второй подход обсуждается в гл. 3, а здесь мы остановимся на первом подходе.

Принципиальное преимущество использования изолированных ядер при исследовании транскрипции состоит в том, что эта система максимально приближается к интактной клетке. В изолированном ядре хроматин сохраняет свое нативное состояние, целостность ядра поддерживается во время бесклеточного синтеза РНК и новообразованная РНК остается связанной с ядром, как и в интактной клетке. Таким образом, в первом приближении активность, измеряемая нами, отражает активность того же ядра в клетке. По-видимому, в изолированном ядре экспрессируются те же самые гены с теми же относительными активностями, что и в интактной клетке.

Однако использование изолированных ядер имеет свои недостатки, которые перечислены ниже.

1. Сложность синтезируемых РНК. Вероятно, в изолированных ядрах транскрибируются все 10^4—10^5 генов, функционирующих в интактной клетке. Следовательно, для изучения синтеза какой-то определенной РНК необходимы особо чувствительные методики (гибридизация).

2. В изолированных ядрах присутствует много РНК-полимераз, уже вовлеченных в транскрипцию РНК, и, следовательно,

начальная РНК-синтезирующая активность, наблюдаемая in vitro, в основном отражает завершение синтеза соответствующих цепей РНК. Поэтому, чтобы различить молекулы, инициированные in vitro, и молекулы, которые были просто достроены, необходимы чувствительные методы анализа инициации синтеза РНК.

3. Изолированные ядра содержат большое количество эндогенной РНК. Если ее не отделить от РНК, синтезированной in vitro, то она будет искажать результаты гибридизации, которую проводят с целью выявить количество новосинтезированной РНК.

Для решения проблем, связанных с перечисленными выше недостатками, в наших лабораториях было разработано несколько полезных методов. Найдены способы измерения относительных скоростей транскрипции и их изменения. Разработаны чувствительные методы измерения инициации цепи с использованием в качестве субстратов тионуклеозидтрифосфатов, а в качестве гибридизационных зондов — соответствующих клонированных последовательностей ДНК. Наконец, поскольку предполагают, что РНК после транскрипции организуется в виде рибонуклеопротеиновых частиц, последние можно использовать при изучении процессинга и транспорта РНК. Мы работали только с клетками культуры миеломы мыши и зародышами морского ежа, но большинство этих методов широко применяется во многих эукариотических системах.

2. Выделение ядер

2.1. Введение

Задача состоит в получении бесклеточной системы, активной в отношении синтеза РНК. Синтезированная РНК и качественно, и количественно должна быть адекватна РНК, синтезируемой в интактных клетках. В частности, должна транскрибироваться нужная цепь ДНК, а инициация, терминация и процессинг должны происходить in vitro в тех же самых сайтах, что и in vivo. Кроме того, in vitro должны экспрессироваться только те гены, которые экспрессируются in vivo. Чтобы получить ядра, адекватно синтезирующие РНК, необходимо, чтобы во время выделения сохранялись РНК-полимеразная активность и структура ядра, но удалялись разрушающие активности (нуклеазы, протеазы, трифосфатазы). Не столь существенно, неочищенны или высокоочищенны ядра, главное, чтобы в них шел адекватный синтез РНК.

Выбор исходного материала для выделения, очевидно, зависит от конкретных целей последующих экспериментов. По воз-

можности лучше всего начинать работу с культивируемыми клетками [1, 2], в частности потому, что большинство клеток млекопитающих в культуре содержит незначительные количества эндогенных нуклеаз и протеаз. Однако если изучают ген, который экспрессируется только в данной ткани, или если его функционирование регулируется определенным образом в ткани интактного животного, то, очевидно, нужно начинать с самой этой ткани. Вместе с тем при работе с тканями возникают многочисленные проблемы, в том числе проблема клеточной гетерогенности. Тем не менее при тщательной постановке эксперимента можно выделить ядра с высокой РНК-синтезирующей активностью из целого ряда тканей [3, 4]. В данном разделе описываются основной метод и его модификации, применимые к клеткам самых различных типов.

2.2. Основной метод

2.2.1. Клетки культуры ткани

Ядра, обладающие высокой активностью в отношении синтеза РНК, легко выделить из клеток HeLa простым лизисом клеток в Nonidet P-40 (NP-40) с последующим осаждением ядер центрифугированием при низкой скорости [5]. Однако клетки HeLa являются исключением. Показано, что для клеток всех других изученных культур наиболее подходящий способ выделения активных ядер — это лизис клеток в изоосмотическом растворе с последующей очисткой ядер путем центрифугирования через плотный раствор сахарозы [1, 2]. Неионный детергент легко вызывает лизис клеток без их предварительного набухания и значительно уменьшает количество цитоплазматических примесей. Основной метод выделения ядер описан в табл. 1. Поскольку плотность ядер зависит от типа клеток, из которых их выделяют, в предварительных опытах следует определить нужную концентрацию сахарозы в буфере II (табл. 1); на основе буфера II готовят сахарозную «подушку», через которую осаждаются ядра (табл. 1, пп. 4 и 5). Например, ядра клеток миеломы не будут седиментировать через сахарозу с концентрацией выше 2,05 М, а ядра ранних зародышей морского ежа не будут седиментировать при концентрациях сахарозы выше 1,95 М. Концентрация сахарозы, при которой ядра седиментируют, лежит в пределах от 1,8 до 2,2 М. Важна также концентрация сахарозы в гомогенате, который наслаивается на сахарозную «подушку» (табл. 1, п. 4). Она должна быть достаточно высокой, чтобы препятствовать накоплению внутриклеточных мембран и органелл в интерфазе, в противном случае выход ядер существенно снижается. Конечная концентра-

Таблица 1. Выделение ядер из клеток культур ткани[1]

1. Приготовьте следующие три буфера, не добавляя к ним ДТТ и тритон Х-100. Проавтоклавируйте их и храните при 4 °С. Перед использованием добавьте ДТТ и тритон Х-100 из концентрированных растворов (1 М ДТТ, 10%-ный тритон Х-100).

   Буфер I
   0,32 М сахароза
   3,0 мМ $CaCl_2$
   2,0 мМ ацетат магния
   0,1 мМ ЭДТА
   0,1%-ный тритон Х-100
   1,0 мМ ДТТ
   10,0 мМ трис-HCl, pH 8,0

   Буфер II
   2,0 М сахароза
   5,0 мМ ацетат магния
   0,1 мМ ЭДТА
   1,0 мМ ДТТ
   10,0 мМ трис-HCl, pH 8,0

   Буфер для хранения
   25%-ный глицерол
   5,0 мМ ацетат магния
   0,1 мМ ЭДТА
   5,0 мМ ДТТ
   50,0 мМ трис-HCl, pH 8,0
2. Отцентрифугируйте клетки (500 *g* 5 мин при 25 °С) и ресуспендируйте их в буфере I до плотности $5 \cdot 10^6$—$2 \cdot 10^7$ клеток/мл[2].
3. Гомогенизируйте клетки (10—15 движениями) в гомогенизаторе Даунса с плотно пригнанным пестиком типа «В».
4. Разбавьте гомогенат одним-двумя объемами буфера II и наслоите его поверх «подушки» из буфера II, занимающей одну треть объема центрифужной пробирки.
5. Отцентрифугируйте при 30 000 *g* 45 мин при 4 °С[3].
6. Ресуспендируйте ядра до концентрации $5 \cdot 10^7$—$2 \cdot 10^8$/мл (0,5—2,0 мг ДНК/мл) в буфере для хранения. Ядра, выделенные из клеток с более низким содержанием ДНК на ядро, хранят при такой же концентрации ДНК.
7. Быстро заморозьте ядра маленькими порциями и храните их в жидком азоте.

[1] При получении ядер из клеток, в которых эндогенные нуклеазы или протеазы могут осложнить выделение, во все буферы следует добавлять ингибиторы, как указано в разд. 2.3.

[2] Перед ресуспендированием в буфере I клетки можно промыть солевым раствором, забуференным фосфатным буфером, но мы считаем, что для клеток из культуры ткани это не обязательно.

[3] Предварительное отделение ядер от гомогената центрифугированием при низкой скорости не дает удовлетворительных результатов. Вместе с ядрами осаждается много постороннего материала, который потом очень трудно отделить от ядер.

ция сахарозы в гомогенате регулируется объемом добавляемого к нему буфера II (табл. 1, п. 4), и ее следует определить в предварительном эксперименте. Например, при получении ядер из зародышей морского ежа нужно повысить концентрацию сахарозы в гомогенате перед центрифугированием до 1,4 М, иначе интерфаза становится комковатой и вязкой из-за скапли-

вающегося в ней мембранного материала [6]. Наконец, очень важно использовать разведенные гомогенаты, так как при этом можно уменьшить и количество материала в интерфазе, и количество побочных примесей, адсорбированных на ядрах. Ядра, замороженные в жидком азоте, сохраняют свою активность в течение нескольких месяцев, но после оттаивания их не следует замораживать вторично.

Мы показали, что данный метод очень хорош при работе с несколькими линиями культивируемых клеток и зародышами морского ежа. Другие исследователи применили аналогичные методы на клетках других типов.

2.2.2. Целые ткани

Основной метод приведенный выше для выделения ядер из культивируемых клеток, можно применять также для выделения ядер из целых тканей после их гомогенизации. Удобная методика описана в табл. 2.

Таблица 2. Выделение ядер из целых тканей

1. Приготовьте буферы согласно табл. 1, п. 1, и добавьте в них ингибиторы, перечисленные в разд. 2.3.
2. Разрежьте ткань на мелкие кусочки[1]. Промойте их в охлажденном вольду 0,14 М NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0.
3. Гомогенизируйте кусочки ткани в буфере I[2], используя подходящий гомогенизатор[3] (10 мл буфера I на 1 г ткани).
4. Быстро профильтруйте гомогенат через несколько слоев марли, чтобы удалить соединительную ткань.
5. Гомогенизируйте фильтрат (10—20 движениями пестика типа «В» в гомогенизаторе Даунса). Контролируйте лизис клеток с помощью микроскопа.
6. Проведите выделение ядер согласно табл. 1, пп. 4—7.

[1] При выделении ядер из печени перед этой стадией промойте печень раствором 0,14 М NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0.
[2] Состав буфера I приведен в табл. 1.
[3] Выбор гомогенизатора зависит от типа ткани. Для мягких тканей, таких, как печень, подходит гомогенизатор Даунса.

2.3. Меры защиты от нуклеаз и протеаз

При работе с клетками, в которых эндогенные протеазы представляют потенциальную опасность, во все буферы, используемые для выделения ядер, и в буфер для хранения следует добавлять PMSF (табл. 1) до конечной концентрации 0,1 мМ (концентрация исходного раствора PMSF в изопропаноле 0,1 М). Он эффективно ингибирует сериновые протеазы, не влияя на синтез РНК. Исключить эндогенную нуклеазную активность гораздо труднее. Нуклеазы, для функционирования которых необходимы двалентные ионы, в том числе многие

Таблица 3. Проверка ДНКазной, РНКазной и протеазной активности изолированных ядер

ДНКаза

Чтобы исследовать ДНКазную активность изолированных ядер, можно проверить, как деградирует либо эндогенная, либо экзогенная ДНК[1]. Второй вариант больше подходит для выявления небольших количеств ДНКазы.

Эндогенная ДНК

1. Проинкубируйте ядра в условиях, идентичных условиям реакции транскрипции (табл. 5), 30 мин, не внося радиоактивные нуклеозидтрифосфаты.
2. Лизируйте ядра добавлением десяти объемов 1%-ного ДСН, 0,5 М NaCl, 10 мМ ЭДТА, pH 8,0. Добавьте протеиназу К до концентрации 50 мкг/мл и проинкубируйте при 37 °С 30 мин.
3. Добавьте равный объем фенола, насыщенного 50 мМ трис-HCl, pH 8,5. Энергично перемешайте и разделите фазы центрифугированием при низкой скорости.
4. Отберите водную фазу и диализуйте ее против 10 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0.
5. Определите размеры выделенной эндогенной ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле, сравнивая ее с ДНК, выделенной из ядер, не инкубированных в условиях транскрипции. Используйте 0,8%-ный агарозный гель и буфер для электрофореза: 1 мМ ЭДТА, 50 мМ трис-борат, pH 8,3. В пробы с ДНК добавьте бромфеноловый синий до конечной концентрации 0,001% и нанесите их на гель. На отдельную дорожку нанесите в качестве маркеров молекулярной массы ДНК фага λ, обработанную рестриктазой *Hind* III, вместе с интактной ДНК фага λ. Проводите электрофорез при 100 В до тех пор, пока бромфеноловый синий не дойдет до края геля. Окрасьте гель бромистым этидием 0,5 мкг/мл 15 мин, чтобы сделать ДНК видимой. Выявите полосы ДНК при УФ-освещении. После инкубации в течение 30 мин ДНК из ядер клеток миеломы мыши, например, должна быть больше 50 kb, а ДНК из ядер морского ежа — больше 20 kb.

Экзогенная ДНК

1. Проинкубируйте ядра в условиях, идентичных условиям реакции транскрипции (табл. 5), 30 мин, добавив сверхспиральную плазмидную ДНК (2 мкг на 0,2 мл реакционной смеси), но не внося радиоактивных нуклеозидтрифосфатов.
2. Выделите ДНК и определите ее размеры с помощью электрофореза в агарозном геле, как описано выше. Исчезновение сверхспиральной ДНК и появление открытой кольцевой ДНК свидетельствуют об одноцепочечных разрывах, что может быть результатом топоизомеразной активности.

РНКаза

1. Проинкубируйте ядра, как описано в табл. 5.
2. Через 5 мин выделите РНК из части реакционной смеси, пользуясь методикой, приведенной в табл. 6.
3. Добавьте 40-кратный избыток (2 мМ) немеченого рибонуклеозидтрифосфата. При этом прекращается включение метки в РНК, но синтез РНК не подавляется. Инкубируйте еще 25 мин и затем выделите РНК из реакционной смеси, как описано в табл. 6.
4. Определите размеры меченой РНК в двух пробах (п. 2 и п. 3, приведенные выше) либо путем центрифугирования в сахарозном градиенте (табл. 7), либо путем электрофореза в агарозном геле (табл. 8). Выявите меченую РНК с помощью сцинтилляционного счетчика или радиоавтографии. Если ядра не содержат значительной РНКазной активности, то РНК в обеих пробах будет высокомолекулярной и будет иметь приблизительно одинаковые размеры. Если требуется, гели можно окрасить бромистым этидием (табл. 8), чтобы определить размеры эндогенной РНК.

Протеаза

1. Проинкубируйте 30 мин ядра, как описано в табл. 5, исключив из реакционной смеси радиоактивный рибонуклеозидтрифосфат.
2. Добавьте равный объем 0,4 М H_2SO_4 и проинкубируйте при 4 °С 30 мин.
3. Отцентрифугируйте при 10 000 *g* 10 мин. Соберите супернатант и добавьте четыре объема этанола. Перемешайте и оставьте смесь при —20 °С на ночь или при —70 °С на 2 ч.
4. Осадите выпавшие в осадок гистоны центрифугированием при 10 000 *g* 10 мин.
5. Промойте осадок гистонов 80%-ным этанолом и затем высушите под вакуумом.
6. Проанализируйте гистоны с помощью электрофореза в геле. Три применяемые методики описаны в литературе [7—9]. Протеазную активность изолированных ядер выявляют по деградации гистонов в инкубированных ядрах по сравнению с гистонами, выделенными из ядер, не подвергавшихся инкубации. Особенно чувствителен к деградации под действием протеазы гистон H1.

[1] Быстрая проверка размеров ДНК заключается в лизисе ядер десятью объемами 1%-ного ДСН, 10 мМ ЭДТА. Если ДНК интактна, то лизированные ядра образуют гель; если же размеры ДНК уменьшились даже очень незначительно (до 20 kb или менее), то раствор выглядит относительно невязким.

ДНКазы [6, 10], ингибируются при удалении всех дивалентных катионов из буфера I (табл. 1) и добавлении ЭГТА до 1 мМ и спермидина до 1 мМ.

Поскольку для точной транскрипции нужна интактная структура хроматина, несмотря на принятие таких защитных мер, важно исследовать ядра на интактность и ДНК, и гистонов. Удобные тесты описаны в табл. 3. Кроме того, ядра можно проверить на присутствие РНКазы с помощью «чейз»-эксперимента (разведения метки; табл. 3). Ядра инкубируют в стандартных условиях транскрипции, но через 5 мин добавляют избыток немеченых рибонуклеотидов (2 мМ) и продолжают инкубацию. Если размеры РНК-продукта, оцениваемые путем центрифугирования в сахарозном градиенте или электрофореза в геле, не изменяются и остаются достаточно большими, то РНКазной активности в этих ядрах практически нет.

2.4. Варианты метода выделения ядер

2.4.1. Клетки, богатые пигментными гранулами или лизосомами

В тех случаях, когда в ткани или в культивируемых клетках имеется большое количество гранул пигмента или лизосом, использование стандартного метода (разд. 2.2) с применением неионного детергента приводит к лизису этих органелл, адсорбции вышедших пигментов на ядрах и, возможно, деградации определенных компонентов ядра вышедшими лизосомными ферментами. Чтобы избежать таких последствий, ядра из клеток этого

типа выделяют по аналогичной методике, но без использования детергента. Клеткам дают набухнуть в 25 мМ KCl, 2 мМ ацетате магния, 10 мМ трис-HCl, pH 7,5, 5 мин при 4 °С и затем гомогенизируют их как обычно (табл. 1 и 2). Гранулы пигмента и лизосомы остаются интактными, и их отделяют от ядер при последующем центрифугировании.

2.4.2. Неводные методы выделения ядер

При использовании водных методов выделения большое количество материала из ядер теряется, в том числе все малые молекулы, многие ферменты и, возможно, часть РНК. Гарни [11] впервые применил неводные методы, с помощью которых получил ядра, содержащие все малые молекулы, в норме присутствующие в ядрах in vivo. Эти ядра активны в отношении синтеза и РНК, и ДНК.

2.5. Выделение хроматина с эндогенной РНК-полимеразной активностью

Из изолированных ядер можно выделить хроматин, в котором сохраняется эндогенная РНК-полимеразная активность [12] (табл. 4). Хроматин, выделенный этим способом, по активности в синтезе РНК почти не уступает интактным ядрам. Однако он теряет активность при замораживании, в то время как ядра можно хранить в жидком азоте несколько месяцев. Методы выделения хроматина и транскрипция экзогенными РНК-полимеразами подробно описаны в гл. 5.

Таблица 4. Выделение транскрипционно активного хроматина[1]

1. Выделите ядра, как описано в табл. 1 или 2.
2. Ресуспендируйте ядра в 10%-ном глицероле, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0, до концентрации $5 \cdot 10^7$ ядер/мл. Отцентрифугируйте суспензию при 1000 *g* 2 мин.
3. Повторяйте стадию 2 до тех пор, пока ядра не лизируются, давая желеобразный осадок (хроматин).
4. Ресуспендируйте хроматин в 1 мл раствора: 0,12 М KCl, 10%-ный глицерол, 1 мМ ДТТ, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0, и отцентрифугируйте суспензию при 1000 *g* 2 мин[2].
5. Ресуспендируйте хроматин при концентрации ДНК 1 мг/мл (10^8 ядер на 1 мл культивируемых клеток мыши) в 10%-ном глицероле, 1 мМ ДТТ, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0, набирая и выпуская суспензию шприцем сначала через иглу для инъекций № 18, а затем № 22.
6. Используйте хроматин для транскрипции сразу после выделения, инкубируя его в условиях синтеза РНК в изолированных ядрах (табл. 5).

[1] См. также табл. 1, гл. 5.

[2] Эта стадия отмывки, предназначенная для удаления нехроматиновых компонентов, не обязательна. В 0,12 М KCl нехроматиновые компоненты растворимы, тогда как хроматин нерастворим.

3. Синтез РНК в изолированных ядрах

3.1. Условия синтеза РНК

Для проведения синтеза РНК ядра инкубируют в присутствии всех четырех рибонуклеозидтрифосфатов, один из которых является радиоактивно меченным. Максимальная скорость транскрипции наблюдается при концентрациях CTP, GTP и UTP по крайней мере 50 мкМ и ATP 100 мкМ. Обычно концентрация в пробах каждого из трех немеченых трифосфатов составляет 500 мкМ, а меченого трифосфата — 50 мкМ (если радиоактивным трифосфатом является ATP, то его концентрация равна 100 мкМ).

В исследованиях in vitro с использованием ДНК-матриц показано, что РНК полимеразы, I, II и III имеют разные оптимумы концентраций солей. Однако, очевидно, в клетке все эти ферменты функционируют в одинаковых условиях, и поэтому был найден один оптимум для синтеза РНК в ядрах млекопитающих для всех трех полимераз: 80 — 120 мМ KCl, 5—8 мМ ацетат магния, 25 мМ трис-HCl, pH 7,5—8,0. Если условия изменяются в указанных пределах, то значительного изменения в активности синтеза не наблюдается. При низких концентрациях соли (<25 мМ KCl) активности РНК-полимераз II и III уменьшаются, и в этом случае функционирует в основном РНК-полимераза I. In vitro в присутствии ДНК-матрицы ионы Mn^{2+} сильно стимулируют РНК-полимеразу II, но в изолированных ядрах даже низкие концентрации ионов Mn^{2+} (1 мМ) ингибируют транскрипцию всеми тремя полимеразами приблизительно на 50%. Добавление полиаминов спермина или спермидина в конечной концентрации 1 мМ не влияет на уровень синтеза суммарной РНК. Подробно метод транскрипции в изолированных ядрах описан в табл. 5. Реакционная смесь состоит из двукратно сконцентрированного раствора различных солей и рибонуклеозидтрифосфатов и равного объема ядер. В качестве радиоактивного предшественника можно использовать любой из четырех [α-^{32}P]-нуклеозидтрифосфатов. Однако, как было показано в наших опытах, в некоторых ядрах, например в ядрах морского ежа, при использовании [α-^{32}P]-UTP метка включается в 3′-конец некоторых РНК. Известны также реакции, в которых [α-^{32}P]-ATP (полиаденилирование или созревание тРНК) или [α-^{32}P]-CTP (созревание тРНК) присоединяются к концам интактных РНК. Кроме того, [α-P^{32}]-GTP является субстратом в реакции кэпирования. Поэтому, несмотря на то, что скорости включения различных меченых трифосфатов близки, в большинстве экспериментов лучше всего использовать [α-^{32}P]-GTP, так как этот нуклеотид меньше других

Таблица 5. Транскрипция в изолированных ядрах

1. Приготовьте следующие три раствора, используя проавтоклавированную дистиллированную воду, и храните их при —20 °С.

Раствор А

2 мМ каждого из нуклеозидтрифосфатов: ATP, CTP, UTP
0,2 мМ [α-^{32}P]-GTP (10—40 Ки/ммоль; 500—1000 мкКи/мл)[1]
0,1 мМ S-аденозилметионин

Чтобы приготовить этот раствор, добавьте по одной десятой конечного объема отдельных концентрированных растворов (20 мМ каждый) ATP, CTP, UTP к одной десятой объема 1 мМ S-аденозилметионина в 1 мМ H_2SO_4. Лиофилизуйте [α-^{32}P]-GTP и вновь растворите его в растворе А, содержащем GTP, так чтобы конечная общая концентрация меченого и немеченого GTP составляла 0,1—0,2 мМ. Важно, чтобы pH раствора был 7,0. Поэтому если используемые нуклеотиды находятся в форме свободных кислот, то доведите pH до 7,0 трисом. Для получения нужного конечного объема добавьте воды.

Раствор Б

0,6 М KCl
12,5 мМ ацетат магния

Раствор В

1%-ный ДСН
10 мМ ЭДТА, pH 7,0

2. В расчете на реакционную смесь с конечным объемом 0,2 мл смешайте 50 мкл раствора А, 40 мкл раствора Б и 10 мкл проавтоклавированной дистиллированной воды. Чтобы началась реакция, добавьте 0,1 мл суспензии ядер в буфере для хранения (табл. 1)[2]. Инкубацию проводите при 25 °С.
3. Чтобы следить за ходом транскрипции, отбирайте пробы (1—5 мкл) в начале инкубации и через 10-минутные интервалы, нанося их на диски фильтровальной бумаги Whatman 1 ММ, помеченные карандашом. Диски положите в ванночку с охлажденной во льду 10%-ной ТХУ и 1%-ным пирофосфатом натрия (15—30 мл на фильтр). Инкубируйте их во льду 10 мин, изредка помешивая. Слейте раствор и сполосните фильтры два раза по 5 мин 5%-ной ТХУ, 1%-ным пирофосфатом натрия. Наконец, сполосните фильтры в абсолютном этаноле или ацетоне, высушите их на воздухе и определите радиоактивность на фильтрах в сцинтилляционном счетчике, используя сцинтиллятор на основе толуола.

   В типичном случае количество радиоактивности, включенной в ТХУ-нерастворимый материал, будет увеличиваться в течение начального 30-минутного периода инкубации в 20—100 раз. В начале инкубации наблюдается значительный фон радиоактивности, возникающий в результате неспецифического связывания меченого нуклеотида с ядрами.
4. Остановите реакцию добавлением десяти объемов раствора В и хорошо перемешайте. Это приводит к лизису ядер и образованию прозрачного вязкого раствора.
5. Проэкстрагируйте РНК по методу, описанному в табл. 6.

[1] Раствор А, состав которого приведен здесь, содержит в качестве меченого рибонуклеозидтрифосфата [α-^{32}P]-GTP. Можно использовать любой другой радиоактивный нуклеотид (см. текст). Во всех случаях конечная концентрация меченого нуклеотида в реакционной смеси должна быть 0,05—0,1 мМ.

[2] Буфер трис-HCl вносят в реакционную смесь (разд. 3.1) с буфером для хранения, в котором суспендированы ядра.

включается в РНК в реакциях, не связанных с транскрипцией. Реакционную смесь инкубируют при 25—37 °С в случае ядер клеток млекопитающих и при 15—25 °С в случае ядер из клеток мор

ского ежа. Обычно предпочитают температуру 25 °С, при которой синтез РНК идет гораздо дольше. По-видимому, нет значительных различий между типами РНК, синтезируемыми при разных температурах в указанных пределах, хотя систематического исследования в этом плане не проводилось. Реакционную смесь инкубируют 30—60 мин и затем выделяют суммарную РНК (разд. 3.3) для последующего анализа.

Если потребуется, можно определить зависимость траскрипции от времени путем отбора проб через различные интервалы времени и определения ТХУ-нерастворимой радиоактивности (табл. 5). Количество синтезированной РНК выражают в пикомолях GMP, включившегося в 1 мкг ДНК за единицу времени. Концентрацию ДНК определяют путем подсчета числа ядер в определенном разведении с помощью гемоцитометра (если известно содержание ДНК в одном ядре) или стандартным колориметрическим методом определения ДНК. Как правило, начальная скорость синтеза РНК составляет 0,1—0,2 пмоль включившегося GMP/мкг ДНК/мин. Синтез РНК обычно продолжается по крайней мере 1 ч, хотя часто с несколько сниженной скоростью — 0,05—0,1 пмоль включившегося GMP на 1 мкг ДНК в 1 мин.

3.2. Определение активности различных РНК-полимераз

Активность трех эукариотических РНК-полимераз можно четко различить с помощью циклического пептида грибов α-аманитина (рис. 1). В концентрации 0,01 мкг/мл он ингибирует активность РНК-полимеразы II млекопитающих на 50%, в то время как РНК-полимераза III ингибируется в такой же степени только при гораздо более высоких концентрациях α-аманитина (25 мкг/мл) [13]. Вместе с тем РНК-полимераза I вообще не ингибируется этим пептидом. Поэтому, чтобы определить долю синтеза РНК, осуществляемого каждой из полимераз, нужно провести три отдельные инкубации (табл. 5): а) без α-аманитина, б) с 0,5 мкг/мл α-аманитина и в) со 100 мкг/мл α-аманитина.

Добавьте α-аманитин в соответствующие реакционные смеси перед добавлением ядер. Затем добавьте ядра и оставьте смеси во льду на 5 мин. Чтобы началась реакция, перенесите смеси на 25 °С.

Разница в количествах РНК, синтезированной в реакциях а) и б), отражает активность РНК-полимеразы II. Разница этих величин между б) и в) отражает активность РНК-полимеразы III, а активность в реакции в) — это активность РНК-полимеразы I. В ядрах, выделенных из клеток, растущих в культуре, 45% синтеза РНК обеспечивается РНК-полимеразой I,

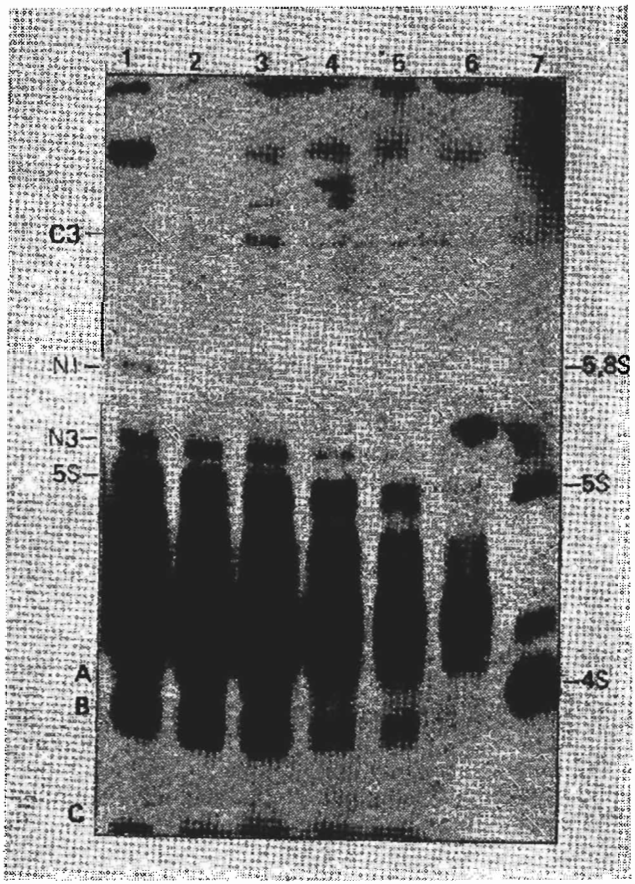


Рис. 1. Синтез РНК в изолированных ядрах морского ежа в присутствии различных концентраций α-аманитина. После выделения из внеядерной фракции РНК была проанализирована методом электрофореза в полиакриламидном геле, как описано в табл. 8. Гель окрашивали бромистым этидием для локализации РНК-маркеров 5,8S, 5S и 4S и затем методом радиоавтографии выявляли радиоактивные РНК-транскрипты. Использовали следующие концентрации α-аманитина: дорожка 1 — α-аманитин отсутствует; дорожка 2—1 мкг/мл; дорожка 3—10 мкг/мл; дорожка 4—100 мкг/мл; дорожка 5 — 250 мкг/мл; дорожка 6 — 500 мкг/мл. На дорожку 7 нанесены 4S-тРНК и 5S-рРНК. N1-РНК-транскрипт является продуктом РНК-полимеразы II, а все остальные РНК — продуктами РНК-полимеразы III. РНК, мигрирующие между 4S и 5S рРНК, являются предшественниками тРНК. N1 и N3 — малые ядерные РНК [6]. С3 — главная малая цитоплазматическая РНК. *A*, *B*, *C* — неидентифицированные РНК, которые in vivo не обнаруживались.

50% — РНК-полимеразой II и 5% — РНК-полимеразой III. В ядрах зародыша (бластулы) морского ежа 90—95% активности обеспечивается РНК-полимеразой II, а остальная часть— РНК-полимеразами I и III. В каждом случае доля суммарной активности, приходящейся на каждую полимеразу, сходна с ее долей in vivo, и это указывает на то, что в условиях, описанных выше, изолированные ядра отражают картину синтеза РНК in vivo.

3.3. Выделение РНК

После завершения реакции РНК можно выделить любым из стандартных методов, применяемых для ядерной РНК: а) экстракцией фенолом в присутствии ДСН при pH 5,0 и 55 °С [14]; б) обработкой ДНКазой I с последующей экстракцией фенолом [15]; в) экстракцией в присутствии гуанидинийизотиоцианата [16].

Метод с гуанидинийизотиоцианатом был разработан для ядер тканей, в которых содержится много эндогенных РНКаз. Обычно его не применяют, так как если транскрипция идет хорошо, то это означает, что ядра не содержат значительных количеств РНКазы (разд. 2.3). При обработке ДНКазой I в препарате РНК остаются небольшие фрагменты ДНК [15]. Поэтому из этих трех методов мы предпочитаем метод с горячим фенолом и ДСН, который описан в табл. 6.

Таблица 6. Выделение РНК

1. После остановки реакции транскрипции добавлением десяти объемов раствора В (табл. 5, п. 4) добавьте $^1/_{10}$ объема 2 М ацетата натрия, pH 5,0 и хорошо перемешайте.
2. Добавьте равный объем смеси насыщенного водой фенола и хлороформа (2 : 1) и хорошо перемешайте.
3. Проинкубируйте смесь при 55 °С 5 мин и затем охладите во льду в течение 5 мин.
4. Отцентрифугируйте смесь при 10 000 *g* 10 мин при 4 °С.
5. Осторожно отберите водную (верхнюю) фазу, стараясь не захватить интерфазу.
6. Добавьте к водной фазе 2,5 объема абсолютного этанола и оставьте при —70 °С на 1 ч (или при —20 °С на 16 ч), чтобы РНК выпала в осадок.
7. Осадите РНК центрифугированием при 10 000 *g* 10 мин при 4 °С.
8. Промойте РНК, ресуспендируя осадок в холодном (4 °С) 70%-ном этаноле с последующим центрифугированием согласно п. 7.
9. Повторите п. 8.
10. Высушите осадок РНК под вакуумом и растворите его в 0,5 мл 0,3 М NaCl, 0,1%-ного ДСН, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl, pH 7,5.
11. Удалите невключившийся меченый нуклеотид путем хроматографии на колонке (0,5×10 см) с сефадексом G50 или биогелем P6 в указанном выше буфере.
12. Осадите РНК из свободного объема этанолом, как описано в пп. 6 и 7.
13. Растворите РНК в стерильной воде и храните при —20 °С.

4. Общий анализ синтеза РНК

Метод, используемый для анализа транскрипции в изолированных ядрах, зависит от целей эксперимента. В разд. 4.1, 4.2 и 4.3 описаны основные приемы анализа суммарных РНК-продуктов, определение скорости элонгации цепей РНК в ядрах и исследование инициации транскрипции соответственно. Описание методов анализа РНК-транскриптов отдельных генов приведено в разд. 5.

4.1. Анализ суммарных РНК-продуктов

Размеры суммарных РНК-продуктов можно определить двумя способами: путем центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (табл. 7 и рис. 2), регистрируя присутствие транскриптов во фракциях по радиоактивности, или с помощью электрофореза небольших РНК-транскриптов в денатурирующих полиакриламидных гелях (табл. 8 и рис. 1), а больших РНК-транскриптов — в денатурирующих агарозных гелях (табл. 8). Если в ядрах нет рибонуклеазы, то размеры РНК-продукта относительно велики ([1] и рис. 2).

Таблица 7. Центрифугирование РНК в сахарозном градиенте

1. Приготовьте сахарозные градиенты 10—40% (вес/объем) в 0,1 М NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0,1%-ном ДСН, 10 мМ трис-HCl, pH 7,5. В этих пределах концентраций сахарозы можно разделить все РНК, представляющие интерес (4—45S).
2. Растворите РНК в 0,1%-ном ДСН, 1 мМ ЭДТА, pH 7,5. Наслоите 0,5 мл раствора РНК на 17 мл градиента или 1,5 мл раствора РНК на 38 мл градиента.
3. Отцентрифугируйте градиенты при 90 000 *g* 16 ч в роторе Sorvall AH627 или Beckman SW27. При данных условиях 28S-РНК седиментирует на расстояние до 60% длины центрифужной пробирки.
4. Разделите каждый градиент на 25 фракций, пропуская его через УФ-детектор, установленный на 254 нм. В изолированных ядрах имеется достаточное количество рРНК (28S и 18S), которая может служить маркером при регистрации УФ-поглощения таким способом. Определите положение меченых РНК-транскриптов, нанеся пробу (5—20 мкл) из каждой фракции на диск фильтровальной бумаги Whatman и определив ТХУ-нерастворимую радиоактивность способом, описанным в табл. 5, п. 3.

Небольшие РНК, в том числе 5S-рРНК и тРНК, можно четко обнаружить и количественно определить с помощью электрофореза в геле, а индивидуальные мРНК необходимо выявлять с помощью чувствительных гибридизационных тестов, описанных в разд. 5.

Таблица 8. Электрофорез РНК в геле

Малые РНК-транскрипты

Малые РПК (<8S) легко анализировать методом электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле в присутствии 7 М мочевины.

1. Приготовьте концентрированный раствор акриламида : бисакриламида (30:1) следующим образом:

Акриламид	30 г
Бисакриламид	1 г
Мочевина	42 г
20Х ТБЭ-буфер[1]	5 мл

Дистиллированная вода до конечного объема 100 мл

2. Дегазируйте нужный для данного электрофорезного аппарата объем концентрированного раствора акриламид : бисакриламид с помощью вакуумного насоса в течение 10 мин. Добавьте 30 мкл TEMED и 0,7 мл свежеприготовленного 10%-ного персульфата аммония на 100 мл гелевой смеси, хорошо перемешайте и залейте гель.
3. Растворите радиоактивную РПК в небольшом объеме дистиллированной воды. Смешайте 10 мкл РНК с 20 мкл 10 М мочевины, 0,1×ТБЭ[1], 0,001%-ного бромфенолового синего, 0,001%-ного ксиленцианола. Прогрейте при 65 °С 10 мин и затем нанесите пробу на гель.
4. Проводите электрофорез при 900—1000 В, используя в качестве электродного буфера 1×ТБЭ[1], пока ксиленцианол не достигнет нижнего края геля[2]. Во время электрофореза пластинки геля должны быть горячими на ощупь.
5. Перенесите гель на фильтровальную бумагу Whatman 3 MM и высушите его, пользуясь специальной сушкой для гелей. Выявите радиоактивную РНК методом радиоавтографии. В другом варианте гель можно окрасить перед сушкой бромистым этидием в концентрации 0,5 мкг/мл в течение 15 мин и выявить эндогенные ядерные РНК при освещении УФ-светом.

Большие РНК-транскрипты

1. Приготовьте 0,8%-ный агарозный гель в 10 мМ фосфате натрия, pH 7,0.
2. Растворите радиоактивную РНК в 1 М деионизованном глиоксале[3], 50%-ном ДМСО, 10 мМ фосфате натрия, pH 7,0, и инкубируйте при 50 °С 1 ч[4]. На этой стадии РНК денатурирует.
3. Нанесите обработанную глиоксалем РНК на гель и проводите электрофорез при 100 В, используя в качестве маркера бромфеноловый синий. Обеспечьте постоянную циркуляцию электродного буфера между катодной и анодной камерами, чтобы не допустить увеличения pH свыше 8,0, иначе РНК будет деглиоксалирована. Продолжайте электрофорез до тех пор, пока краска не пройдет две трети высоты геля[5].
4. Выявите радиоактивную РНК методом радиоавтографии. Если при электрофорезе использовали маркерные РПК (например, 28S- и 18S-рРНК), то их можно увидеть после окрашивания геля бромистым этидием.

[1] ТБЭ-буфер имеет состав: 50 мМ трис, 50 мМ борная кислота, 50 мкМ ЭДТА.

[2] Скорость миграции тРНК составляет 80% скорости миграции ксиленцианола.

[3] Приготовьте 3 М глиоксаль (Sigma) в воде и деионизуйте его пропусканием через колонку (1 мл) со смолой Biorad AG501-X8. Раствор для обработки глиоксалем имеет состав: 3 М глиоксаль, 67%-ный ДМСО, 10 мМ фосфат натрия, pH 7,0.

[4] Обработка РНК глиоксалем описана в работе [17].

[5] тРНК мигрирует впереди бромфенолового синего.

4.2. Скорость элонгации

Среднюю скорость элонгации определить довольно легко методом, подробно описанным в табл. 9. С этой целью ядра инкубируют в течение короткого периода времени (0,5—1,0 мин) с

Таблица 9. Измерение скорости элонгации РНК

1. Внесите ядра в стандартную реакционную смесь для транскрипции (табл. 5), содержащую все четыре немеченых рибонуклеозидтрифосфата в обычных концентрациях и не содержащую меченый GTP.
2. Проинкубируйте 5 мин при нужной температуре.
3. Добавьте необходимое количество [α-^{32}P]-GTP. Через 0,5—1,0 мин остановите реакцию добавлением десяти объемов 1%-ного ДСН, 10 мМ ЭДТА, pH 7,0.
4. Выделите РНК, как описано в пп. 1—6 табл. 6.
5. Растворите РНК в 0,5 мл 1%-ного ДСН, 1 мМ ЭДТА, pH 7,0 и проанализируйте ее путем центрифугирования в сахарозном градиенте, как описано в табл. 7. На этой стадии большие по размеру РНК (которые еще продолжают элонгироваться) отделяются от малых РНК (разд. 4.1). Объедините фракции градиента, содержащие РНК с размерами более 15S.
6. Осадите собранную РНК этанолом (табл. 6, пп. 6 и 7).
7. Растворите РНК в 20 мкл 10 мМ ацетата натрия, pH 5,0. Добавьте по 10 ед. РНКазы T1 (Sigma) и РНКазы T2 (Sigma) и проинкубируйте при 37 °С 3 ч.
8. Нанесите гидролизат на хроматографическую бумагу Whatman 3 MM (10×45 см) и на отдельную дорожку радиоактивные GMP и гуанозин в качестве маркеров. Высушите пятна феном.
9. Фракционируйте пробы методом восходящей хроматографии в смеси бутан-1-ол : 0,1 М хлорид аммония (6 : 1) 16 ч при комнатной температуре.
10. Высушите хроматографическую бумагу в вытяжном шкафу, после чего разрежьте ее поперек на полоски шириной 0,5 см.
11. Погрузите каждую полоску в 1 мл воды на 1 ч.
12. Отберите водные элюаты, добавьте по 10 мл тритон-толуольного сцинтиллятора[1] к каждому из них и просчитайте на счетчике. Определив положение маркеров GMP и гуанозина, определите радиоактивность того и другого в пробах РНК-транскриптов.

Длина РНК, образовавшейся при инкубации, определяется отношением радиоактивности в GMP к радиоактивности в гуанозине. Чтобы получить скорость элонгации, эту величину нужно разделить на время инкубации.

[1] Смесь 13,5 г омнифлуора (NEN), 1 л тритона X-100 и 2 л толуола.

[^{3}H]-GTP или каким-либо другим [^{3}H]-нуклеозидтрифосфатом. РНК выделяют, расщепляют РНК-азами T1 и T2 и образующиеся нуклеотиды и нуклеозиды разделяют методом хроматографии на бумаге [18]. Отношение радиоактивности в GMP к радиоактивности в свободном гуанозине определяет размеры РНК-транскрипта, синтезированного во время инкубации, и соответственно позволяет оценить скорость элонгации. Перед расщеплением небольшие РНК удаляют центрифугированием в сахарозном градиенте, так как они не входят в число новообразующихся транскриптов. В ядрах миеломы мыши [18] типичная скорость элонгации равна приблизительно 5 нуклеотидам/с. При такой скорости молекула 45S-рРНК-предшественника (длиной 10 000 нуклеотидов) должна полностью синтезироваться in vitro за 30 мин.

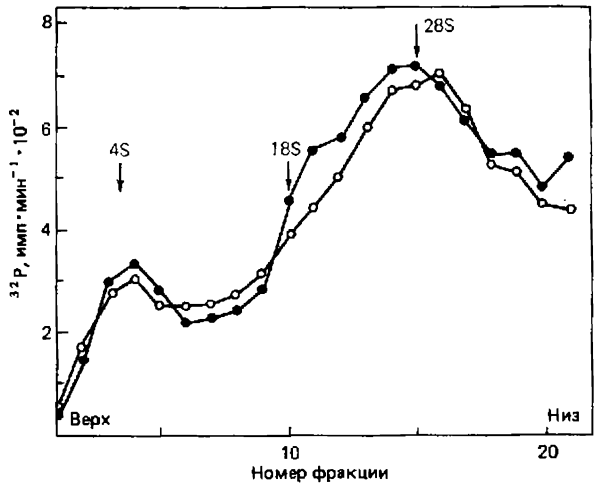


Рис. 2. Синтез РНК в изолированных ядрах клеток миеломы мыши в течение 30 мин с использованием [α-^{32}P]-GTP в качестве радиоактивного меченого предшественника. Затем РНК фракционировали в сахарозном градиенте, как описано в табл. 7. Градиентные профили относятся к РНК, синтезированной в условиях, описанных в табл. 5 (светлые кружки), и РНК, синтезированной в присутствии клеточного экстракта (темные кружки), как описано в разд. 6.4. В качестве маркеров использовали 28S- и 18S-рРНК (положения показаны стрелками).

Скорость синтеза РНК, определяемая по включению [α-^{32}P]-GTP в ТХУ-нерастворимый материал (табл. 5, п. 3), составляет приблизительно 0,1—0,2 пмоля включенного GMP/мкг ДНК/мин, что соответствует 5—10% скорости in vivo. Вместе с тем скорость элонгации in vitro (5 нуклеотидов/с) составляет 20% скорости in vivo (25 нуклеотидов/с). Отсюда следует, что, по-видимому, не все молекулы РНК-полимеразы, инициировавшие РНК-транскрипты in vivo, одновременно участвуют в элонгации in vitro.

4.3. Инициация синтеза РНК

4.3.1. Использование [γ-^{32}P]-нуклеозидтрифосфатов

Первичный транскрипт содержит на 5′-конце инициированной молекулы РНК структуру pppXp. Включение в РНК [γ-^{32}P]-рибонуклеозидтрифосфата и сохранение радиоактивного γ-фосфата на 5′-конце обычно используют для измерения инициации цепей РНК in vitro [2, 12] по методике, приведенной в табл. 10, *А*. Эта методика, с помощью которой регистрируют включение одного радиоактивного атома в один инициирован

ный транскрипт, наиболее эффективна при анализе коротких частей инициирующихся повторно транскриптов [2, 12], например 5S-РНК и тРНК. Она применима только в тех случаях, когда РНК-продукт сохраняет свой трифосфатный конец, т. е. не кэпируется.

4.3.2. Использование γ-тионуклеозидтрифосфатов

Использование [γ-^{32}P]-рибонуклеозидтрифосфата для исследования инициации РНК по методу, упомянутому выше, зависит от возможности обнаружения единственного нуклеотида в новообразованной РНК, имеющего [^{32}P] в γ-положении. Если изучаемая РНК очень длинная или in vitro инициируется недостаточно часто, анализ инициации транскрипции этим методом становится практически невозможным, поскольку уровень радиоактивности, соответствующий этой РНК, недостаточен для детектирования. Кроме того, γ-фосфат обычно быстро выводится из первичных транскриптов в таких сложных системах, как ядра, в результате кэпирования или действия фосфатаз.

Экштейн был первым, кто предложил использовать тионуклеотиды в исследованиях метаболизма нуклеиновых кислот [19] и сам широко применял их при изучении стереохимии ферментативных реакций [20]. Мы решили применить [γ-S]-рибонуклеозидтрифосфаты для специфического мечения РНК, инициируемой in vitro, которую затем можно выделить методом аффинной хроматографии на ртутьорганическом носителе, а именно на Hg-агарозе или Hg-целлюлозе [21, 22]. Использование такого аффинного мечения в сочетании с [α-^{32}P]-рибонуклеозидтрифосфатами позволяет выделять РНК, транскрибированную in vitro, с гораздо более высокой удельной активностью, чем при использовании [α-^{32}P]-рибонуклеозидтрифосфатов. При этом устраняется конкуренция со стороны РНК, которая во время реакции транскрипции только элонгируется. К тому же [γ-S]-нуклеотиды устойчивы к действию фосфатазы, а после включения в РНК препятствуют кэпированию [23]. Исследования с применением ингибирования α-аманитином показывают, что в ядрах миеломы мыши все три РНК-полимеразы могут утилизировать γ-тиоаналоги [22]. Кроме того, было обнаружено, что скорость синтеза РНК обычно выше при использовании [γ-S]-нуклеотидов, чем при использовании незамещенных нуклеотидов, по-видимому, благодаря более высокой стабильности первых, хотя это предположение еще нужно доказать. Таким образом, этот метод можно использовать для исследования продуктов транскрипции, синтезируемых с помощью эукариотических РНК-полимераз всех трех классов, в том числе мРНК и вирусных РНК [22, 24].

Таблица 10. Исследование инициации синтеза РНК

А. Использование [γ-^{32}P]-*нуклеозидтрифосфатов*[1]

1. Проинкубируйте ядра, как описано в табл. 5, добавив [γ-^{32}P]-GTP или [γ-^{32}P]-ATP (1—5 мКи/мл; 200 Ки/ммоль).
2. Выделите РНК, как описано в табл. 6.
3. Растворите пробу РНК в 20 мкл 10 мМ ацетата натрия, pH 5,0. Добавьте по 10 ед. РНКазы T1 (Sigma) и РНКазы T2 (Sigma) и проинкубируйте 3 ч при 37 °С.
4. Если произошла инициация синтеза РНК, то после гидролиза РНКазами T1 и T2 метка [^{32}P] будет присутствовать в pppGp или pppAp. Эти радиоактивные тетрафосфаты могут быть обнаружены методом тонкослойной хроматографии на PEI-целлюлозе с использованием в качестве элюирующего хроматографического раствора 1,5 М KH_2PO_4, pH 3,5.

Б. Использование γ-*тионуклеозидтрифосфатов*

1. Проинкубируйте ядра, как описано в табл. 5, добавив [γ-S]-GTP или [γ-S]-ATP (Boehringer) вместо GTP или ATP[2]. Один или несколько из других трех нуклеозидтрифосфатов можно пометить [α-^{32}P]. Можно также использовать [γ-S] [β-^{32}P]-GTP или [γ-S] [β-^{32}P]-ATP [19, 20].
2. Выделите РПК, как описано в табл. 6, но для хроматографического разделения на сефадексе G50 или биогеле P6 используйте 0,1%-ный ДСП, 0,1 М NaCl, 20 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl, pH 7,9 (табл. 6, п. 11).
3. После фракционирования на сефадексе G50 объедините фракции РНК, соответствующие свободному объему, и нанесите их на колонку, содержащую 1—2 мл Hg-агарозы или Hg-целлюлозы, которая предварительно уравновешена буфером, описанным в п. 2.
4. Промойте колонку с Hg-агарозой или Hg-целлюлозой десятью объемами буфера, состав которого приведен выше, в п. 2.
5. Элюируйте специфически связавшуюся РНК (γ-S-РНК) 10 мМ ДТТ или 1%-ным 2-меркаптоэтанолом в этом же буфере. РНК, элюирующаяся при этих условиях, должна быть продуктом инициации in vitro.

В. Использование β-*тионуклеозидтрифосфатов*

Описано в работах [32, 33].

[1] Поскольку радиоактивный фосфат включается в РНК-транскрипт только по 5′-концу, этот способ исследования инициации применяют только в тех случаях, когда такие транскрипты составляют значительную часть конечного РНК-продукта (например, 5S рРНК или тРНК) и имеют на конце трифосфаты (т. е. не кэпированы).

[2] Чтобы показать, что сера действительно включается по 5′-концу РНК, добавьте в инкубационную смесь in vitro (табл. 5) [γ-S][β-^{32}P]-GTP или [γ-S][β-^{32}P]-ATP, затем выделите РНК (табл. 6) и проведите анализ распределения включившейся метки следующим образом. К РНК добавьте NaOH до конечной концентрации 0,3 М и проинкубируйте пробу при 37 °С 18 ч для того, чтобы прошел гидролиз РНК. Выделите серусодержащие нуклеотиды методом хроматографии на Hg-агарозе, как описано в пп. 3–5 табл. 10, *Б*. Добавьте к этим нуклеотидам 1 мг дрожжевой тРНК (предварительно расщепленной РНКазой) и хроматографируйте эту смесь на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой в 1 мМ 2-меркаптоэтаноле, 7 М мочевине, 50 мМ трис-HCl, pH 8,0. Элюируйте нуклеотиды линейным градиентом 0,05–0,30 М NaCl. Измерьте радиоактивность собранных фракций. При данных условиях нуклеозидтетрафосфат имеет общий заряд —6, и поэтому серусодержащие нуклеотиды, меченные ^{35}P, должны элюироваться вместе с ним.

Использование [γ-S]-рибонуклеозидтрифосфатов для анализа инициации синтеза РНК описано в табл. 10, *Б*. В качестве аффинного носителя для очистки РНК-транскриптов можно использовать Hg-агарозу или Hg-целлюлозу. Hg-агарозу готовят с использованием биогеля A-15M [25]. Чтобы свести к минимуму образование сшивок при активации геля, следует использовать низкую концентрацию бромциана (<10 мг/мл). Hg-ага-

розный гель, приготовленный путем активации с бромцианом (2,5 мг/мл), имеет высокую связывающую активность, и на нем одинаково хорошо идет отбор РНК всех размеров [21]. Приготовление Hg-целлюлозы описано в табл. 11.

Таблица 11. Приготовление Hg-целлюлозы

1. Проинкубируйте порошок целлюлозы в 5 М NaOH в течение ночи при 4 °С в атмосфере азота.
2. Промойте целлюлозу на фильтре 100 объемами воды и затем 100 объемами 0,75 М карбоната калия, pH 11,0.
3. Ресуспендируйте промытую целлюлозу в 0,75 М карбонате калия, pH 11,0, до конечной концентрации 2,5 г/100 мл. Добавьте бромциан (0,5 г/мл в диоксане) до конечной концентрации 25 мг/мл.
4. Активация должна происходить в течение 6 мин при комнатной температуре. Поддерживайте pH 11,0, добавляя 10 М KOH.
5. Быстро профильтруйте активированную целлюлозу и промойте ее 100 объемами холодной воды, затем 100 объемами холодного 50%-ного ДМСО и, наконец, 50 объемами 100%-ного ДМСО при комнатной температуре.
6. Ресуспендируйте целлюлозу в концентрации 0,1 г/мл в ДМСО и добавьте *n*-аминофенилмеркурацетат до концентрации 20 мМ (используя 1 М раствор этого реагента в ДМСО). Перемешивайте суспензию в течение ночи при комнатной температуре.
7. Профильтруйте Hg-целлюлозу. Ресуспендируйте ее в 0,4 М 2-амино-2-метил-1,3-пропандиоле, растворенном в ДМСО, и перемешивайте в течение ночи при комнатной температуре.
8. Промойте Hg-целлюлозу 100 объемами 50%-ного ДМСО и затем 100 объемами воды. Храните при 4 °С в 0,01%-ном азиде натрия.

4.3.3. Использование β-тионуклеозидтрифосфатов

[γ-S]-ATP и [γ-S]-GTP с успехом применялись для изучения транскрипции в ядрах различных клеток: миеломы мыши [26, 27], дрожжевых [28], *Xenopus* [29], *Physarum* [30] и клеток мыши, инфицированных вирусом [24]. Однако примеси РНКазы в неочищенных препаратах ядер могут вызывать сильную деградацию ядерной РНК, что приведет к артефактам в исследованиях инициации, поскольку образующиеся при этом фрагменты РНК со свободными 5′-гидроксильными группами могут метиться [γ-S]-нуклеотидами, действующими как доноры фосфата для эндогенной полинуклеотидкиназы [31]. В таких случаях вместо [γ-S]-рибонуклеозидтрифосфатов можно использовать [β-S]-рибонуклеозидтрифосфаты [32, 33], поскольку последние не являются субстратами для полинуклеотидкиназы [34]. Однако другие стороны синтеза РНК (в частности, кэпирование) еще не изучали с использованием [β-S]-нуклеотидов. Более того, не ясно, в какой степени способны различные эукариотические РНК-полимеразы использовать [β-S]-нуклеотиды в качестве

субстратов. Наконец, в отличие от [γ-S]-нуклеотидов (разд. 4.3.2) [β-S]-нуклеотиды еще не поступают в продажу, и поэтому их приходится синтезировать в лаборатории [32, 33].

4.3.4. Кэпирование РНК in vitro

Кэпирование транскриптов, синтезируемых РНК-полимеразой II in vivo, в норме происходит вскоре после инициации синтеза РНК. Существует несколько структур кэпа. Их можно классифицировать в соответствии с числом молекул рибозы, которые метилируются в структуре ^{m}GpppXpYpZpN... Структура кэп 0 (в природе обнаруживаемая в дрожжах) не содержит О-метильных групп. Структура кэп I (О-метилированная рибоза только в X-нуклеозиде) и структуры кэп II (О-метилированная рибоза содержится и в X-, и в Y-нуклеозидах) находятся в мРНК млекопитающих. Первая реакция О-метилирования идет в ядре и структуры кэп I обнаруживаются в гяРНК, а вторая реакция О-метилирования, возможно, проходит в цитоплазме, поскольку структуры кэп II не обнаруживаются в гяРНК. При образовании кэпа два фосфата происходят из α- и β-фосфатов включившегося первым рибонуклеозидтрифосфата и один — из α-фосфата GTP, используемого в реакции кэпирования. После образования кэпа гуанозин метилируется в положении 7. Помимо мРНК структуры кэп II содержат также малые ядерные РНК млекопитающих (типа U). В этом случае гуанозин метилируется дважды по 2-аминогруппе, а также в положении 7 с образованием 2,2,7-триметилгуанозина.

Если в качестве предшественника используют [α-^{32}P]-GTP, то кэпы, образующиеся in vitro, будут мечеными. Кэп можно также пометить с помощью ATP, GTP, UTP или CTP, содержащих [^{32}P] в β-положении. В последнем случае метка в кэпе происходит от первого нуклеотида в цепи РНК. Поэтому включение α-фосфата из меченого GTP в кэп синтезированной in vitro РНК свидетельствует о том, что РНК была кэпирована in vitro, а включение [β-^{32}P]-нуклеозидтрифосфата в кэп in vitro означает, что транскрипция была инициирована in vitro. Таким образом, хотя формально кэпирование является посттранскрипционной модификацией, здесь мы рассматриваем его как потенциальный тест на инициацию синтеза РНК in vitro. При использовании любого радиоактивного предшественника необходимо отделить большое количество нуклеотидов, включенных в РНК во время элонгации, от кэпа, чтобы последний можно было проанализировать. Сделать это можно методом, описанным в табл. 12. Согласно этому методу, РНК гидролизуют РНКазами T1 и T2 с последующей хроматографией на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. Так можно разделить струк-

Таблица 12. Выявление кэпов в РНК: метод А [35]

1. Проинкубируйте ядра в системе транскрипции in vitro, как описано в табл. 5, добавив в реакционную смесь S-аденозилметионин в конечной концентрации 20 мкМ. В качестве меченого радиоактивного предшественника используйте [α-^{32}P]-GTP, [β-^{32}P]-нуклеозидтрифосфат или [^{3}H]S-аденозилметионин (500 мкКи/мл).
2. Выделите РНК, как описано в табл. 6.
3. Растворите РНК в 50 мкл 50 мМ трис-HCl, pH 7,5.
4. Добавьте по 10 ед. РНКазы T1 и РНКазы T2 (Sigma) и проинкубируйте при 37 °С 3 ч. Продуктами этого гидролиза будут мононуклеотиды, олигонуклеотиды с 2′-0-метилированными остатками рибозы и набор кэп-структур (разд. 4.3.4).
5. Добавьте 100 мкг РНК-носителя (например, рРНК или тРНК), гидролизованного панкреатической РНКазой (10 мкг, 37 °С, 1 ч).
6. Смешайте продукты гидролиза РНК с 1 мл 7,0 М мочевины, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl, pH 7,5, и нанесите смесь на колонку (0,6×30,0 см) с ДЭАЭ-целлюлозой, предварительно уравновешенной этим буфером. Проведите элюцию с колонки градиентом NaCl 0—0,35 М (в общем объеме 100 мл) в этом же буфере. Непрерывно регистрируйте A_{254} элюата и собирайте фракции по 2 мл для определения их радиоактивности по Черенкову. УФ-поглощение обусловлено гидролизатом РНК-носителя (п. 5) и показывает место выхода в процессе элюции различных по размеру олигонуклеотидов. Разделение происходит по величине заряда (рис. 3). Радиоактивность, элюируемая с тринуклеотидами и олигонуклеотидами большего размера, может соответствовать кэп-структуре в РНК, синтезированной in vitro; структуры кэп 0 элюируются с тринуклеотидами, структуры кэп I — с тетрануклеотидами и структуры кэп II — с пентануклеотидами (рис. 3).
7. Объедините колоночные фракции, элюированные при заряде от —4 до —7.
8. Разбавьте объединенные фракции тремя объемами воды. Нанесите пробы на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой, приготовленную в пастеровской пипетке и предварительно уравновешенную водой.
9. Промойте колонку четырьмя объемами воды, чтобы удалить соли и мочевину, и затем элюируйте нуклеотиды минимальным объемом 2,0 М бикарбоната триэтиламмония, pH 7,5.
10. Элюат лиофильно высушите.
11. Растворите остаток нуклеотидов в 200 мкл воды.
12. Повторяйте пп. 10 и 11, пока не будет удален весь бикарбонат триэтиламмония (3—4 раза).
13. Чтобы подтвердить наличие кэпов, обработайте олигонуклеотиды нуклеазой P1 и щелочной фосфатазой (Sigma). Для этого растворите лиофилизованные нуклеотиды в 10 мкл 10 мМ ацетата натрия, pH 5,8, добавьте 5 мкг нуклеазы P1 и инкубируйте при 37 °С 1 ч. Затем доведите pH смеси до pH 7,0 — 8,0, пользуясь 1 М трис-HCl, pH 9,0, и добавьте щелочную фосфатазу до конечной концентрации 2 мкг/мл. В процессе инкубации при 37 °С в течение 3 ч все кэп-структуры превращаются в структуры кэп I (разд. 4.3.4), а олигонуклеотиды — в нуклеозиды и неорганический фосфат.
14. Отделите кэпы от нуклеозидов методом тонкослойного электрофореза на пластинке с целлюлозой (20×20 см, Kodak Ltd) при 200 В в течение 3 ч в 5%-ной уксусной кислоте, 0,5%-ном пиридине, 1 мМ ЭДТА. Электрофорез проводите до тех пор, пока маркер ксиленцианол не мигрирует на 9—10 см. Другой вариант отделения осуществляют с помощью восходящей тонкослойной хроматографии на PEI-целлюлозе в 0,5 М KH_2PO_4, доведенном до pH 3,5 фосфорной кислотой. В этом случае продолжайте

хроматографию до тех пор, пока буфер не достигнет верха пластинки. Подходящие кэп-маркеры (P-L Biochemicals) детектируются при УФ-освещении после электрофореза или хроматографии.

15. Поскольку существуют кэпирующие нуклеотиды двух типов (7-метилгуанозин в мРНК [8] и 2,2,7-триметилгуанозин в мяРНК [8]), необходимо их разделить. Элюируйте кэпы с пластинки с тонким слоем целлюлозы (после электрофореза в п. 14) водой или с пластинки с PEI-целлюлозой (после хроматографии в п. 14) 2М бикарбонатом триэтиламмония, pH 7,5.
16. Лиофилизуйте элюированный материал.
17. Растворите кэпы в 5 мкл 10 мМ ацетата натрия, pH 5,0, и добавьте 10 ед. кислой пирофосфатазы табака (BRL). Инкубируйте пробы при 37 °С 2 ч.
18. Лиофилизуйте и растворите в 1—2 мкл дистиллированной воды.
19. Отделите 7-метилгуанозинмонофосфат от 2,2,7-триметилгуанозинмонофосфата методом двумерной тонкослойной хроматографии. Нанесите гидролизат на пластинку с тонким слоем целлюлозы (20×20 см; Kodak Ltd) и проведите хроматографию в смеси изомасляная кислота : аммиак : вода (66 : 1 : 33) в первом направлении и в смеси 0,1 М натрийфосфатный буфер, pH 6,8 : сульфат аммония : пропан-1-ол (100 : 60 : 2, объем/вес/объем) во втором направлении [37]. В качестве маркеров при хроматографии используйте четыре рибонуклеозид-5′-монофосфата и 7-метилгуанозинмонофосфат (P-L Biochemicals).

На рис. 3 показано типичное разделение.

Таблица 13. Выявление кэпов в РНК: метод Б [36]

1. Проинкубируйте ядра в системе для транскрипции in vitro, как описано в табл. 5, добавив в реакционную смесь S-аденозилметионин в конечной концентрации 20 мкМ. В качестве радиоактивного предшественника внесите 500 мкКи [α-^{32}P]-GTP, [β-^{32}P]-нуклеозидтрифосфата или [^{3}H]S-аденозилметионина.
2. Выделите РНК методом, описанным в табл. 6.
3. Растворите РНК в 10 мкл 0,1 М смеси муравьиная кислота — пиридин, pH 6,0, и добавьте 10 мкг нуклеазы P1. Проинкубируйте при 37 °С 3 ч.
4. Высушите пробу и растворите ее в 10 мкл 0,1 М бикарбоната аммония, pH 8,0, добавьте 0,5 ед. щелочной фосфатазы (Worthington) и проинкубируйте при 37 °С 1 ч.
5. Высушите гидролизат под вакуумом. Растворите остаток в небольшом объеме воды и снова высушите. Повторите эту операцию 2—3 раза, чтобы удалить все следы бикарбоната аммония.
6. Растворите нуклеотиды в минимальном объеме воды и нанесите раствор на предварительно увлажненные полоски ацетатцеллюлозы. Используйте в качестве маркеров ксиленцианол (синий) и кислый фуксин (розовый). Проводите электрофорез при 2000—3000 В в смеси: 5%-ная уксусная кислота — 0,5%-ный пиридин — 5 М мочевина, pH 3,5, до тех пор, пока кислый фуксин не пройдет 20—25 см. Затем перенесите полоску прямо на пластинку с PEI-целлюлозой (20×20 см). Расположите полоску таким образом, чтобы ее начало пришлось на один край PEI-пластинки, а кислый фуксин выходил за ее пределы на другом.
7. Проводите хроматографию на PEI-пластинке в смеси 1,3 М муравьиная кислота — пиридин, pH 4,2, до тех пор, пока фронт буфера не достигнет верха пластинки.
8. Высушите пластинку и экспонируйте ее с рентгеновской пленкой, используя усиливающий экран Dupont Lightning-Plus. Идентифицируйте кэпы с помощью соответствующих маркеров (P-L Biochemicals).
9. Элюируйте кэпы 2,0 М бикарбонатом триэтиламмония, pH 7,5, и проанализируйте их согласно пп. 16—19 табл. 12.

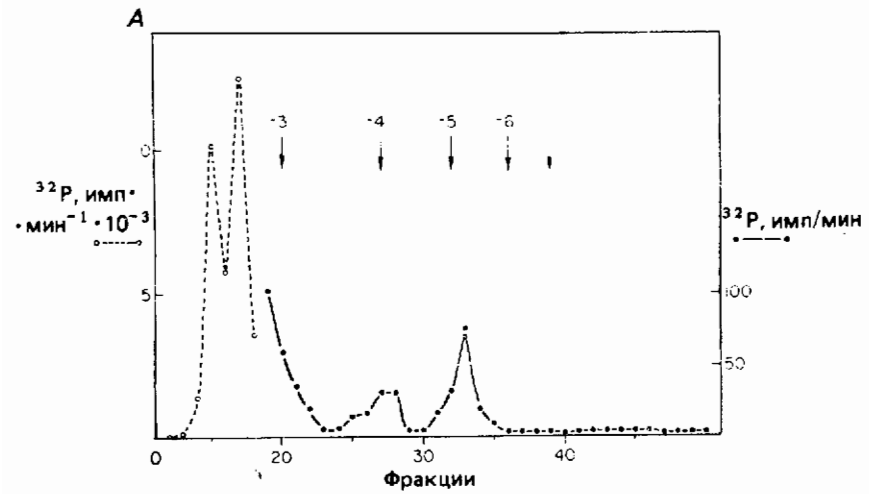
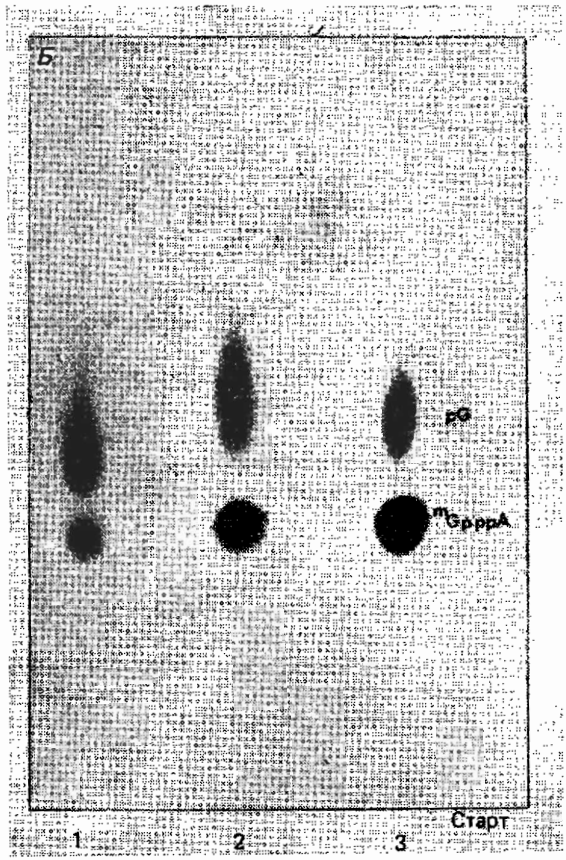
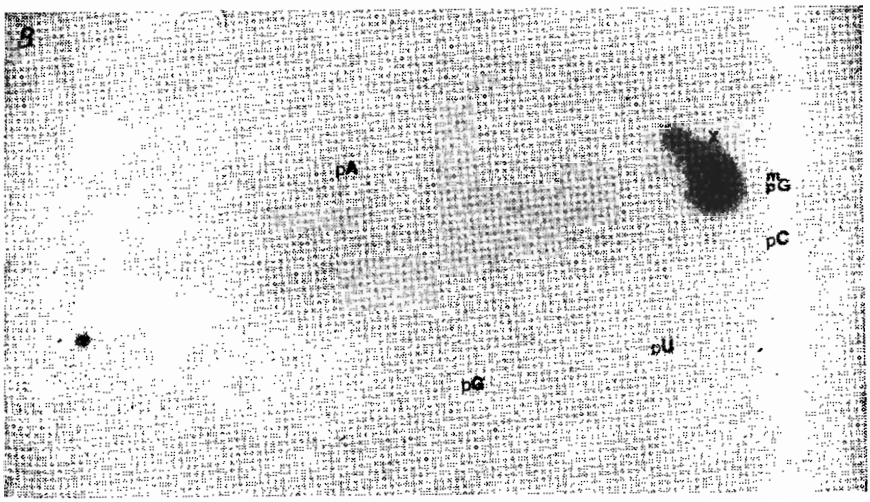


Рис. 3. Кэпирование РПК in vitro. *А*. РНК была синтезирована в ядрах in vitro в присутствии [^{32}P]-GTP (табл. 5), гидролизована РПКазами Т1 и Т2 и нанесена на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой в 7,0 М мочевине (табл. 12, пп. 1—6). РПК была гидролизована панкреатической РНКазой, и гидролизат служил источником маркеров заряда. Олигонуклеотиды элюировали градиентом 0—0,35 М NaCl в 7 М мочевине, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl, pH 7,5. Положение олигонуклеотидов определенного размера (указанное стрелкой и числом, обозначающим их суммарный заряд) детектировали путем непрерывной регистрации поглощения элюата при 254 нм. Элюат собирали в виде фракций и радиоактивность каждой фракции определяли по Черенкову. Поскольку 98% элюированной радиоактивности находится в виде мононуклеотидов, масштаб, начиная с определенной точки графика, пришлось изменить. Светлые кружки и штриховая линия соответствуют [^{32}P] в имп/мин·10^{-3}, а темные кружки и сплошная линия — [^{32}P] в имп/мин. *Б*. Колоночные фракции, относящиеся к материалу, элюируемому в области зарядов —4, —5, —6 и —7, были объединены, обессолены и обработаны нуклеазой P1, а затем щелочной фосфатазой (табл. 12, пп. 7—13). Нуклеотиды были разделены методом тонкослойного электрофореза при pH 3,5 (табл. 12, п. 14). GMP (pG), обнаруживаемый в пробах, может происходить из О-метилгуанозина в структурах кэп I и кэп II или из неполного гидролизата исходной РНК. Дорожка 1 — продукты гидролиза, элюируемые с зарядом —4; дорожка 2 — продукты гидролиза, элюируемые с зарядом —5; дорожка 3 — продукты гидролиза, элюируемые с зарядом —6 и —7. *В*. Кэп-структуры (^{m}GpppA), выявленные на хроматограмме рис. *Б*, элюировали водой, гидролизовали кислой фосфатазой табака и гидролизат разделяли методом двумерной тонкослойной хроматографии, как описано в табл. 12 (пп. 15—19). Пятно *X*, вероятно, является 2,2,7-триметилгуанозинмонофосфатом. Указаны положения маркеров AMP (pA), GMP (pG), CMP (pC) и UMP (pU), определенных при освещении ультрафиолетом, а также положение маркера 7-CH_3-GMP(^{m}pG). Клонированные ДНК любезно предоставлены д-ром Хо и д-ром Стаффордом.


Б
pG
mGpppA
Старт
1
2
3


В
pA
mGpG
pC
pU
pG

туры кэп 0, кэп I и кэп II, образующиеся при РНКазном гидролизе [GpppXp, GpppX(m)pYp, GpppX(m)pY(m)pZp соответственно]. Однако во фракцию кэпов в виде примесей могут попасть внутренние фрагменты РНК, имеющие О-метильные группы [например, X(m)pY(m)pZp], или не до конца гидролизованная РНК. Поэтому материал, элюируемый с ДЭАЭ-целлюлозы с зарядами от —4 до —7, гидролизуют нуклеазой P1 и щелочной фосфатазой, в результате чего получают «сердцевину» кэпа ($GpppX_{OH}$), которую затем характеризуют с помощью гидролиза нуклеотидпирофосфатазой (Sigma) или кислой пирофосфатазой табака (BRL) с последующим разделением мононуклеотидов двумерной тонкослойной хроматографией. На рис. 3 приведен типичный анализ кэпирования РНК in vitro в соответствии с описанной выше методикой.

Другой подход [36] позволяет обнаруживать «сердцевину» кэпа одноэтапным методом (табл. 13). В соответствии с ним РНК, синтезированную in vitro, гидролизуют нуклеазой P1 и образующиеся нуклеотиды разделяют электрофорезом на ацетат-целлюлозе с последующей хроматографией на PEI-целлюлозе. Бо́льшая часть метки, включенной в РНК, при гидролизе оказывается во фракции монофосфатов, и кэпы (GpppX(m)p) можно обнаружить и идентифицировать с помощью маркеров (например, фирмы P-L Biochemicals).

С помощью этого метода [36] было убедительно показано включение [β-^{32}P]-ATP и [β-^{32}P]-GTP в кэпы РНК SV40 во время транскрипции в изолированных ядрах.

В целом после транскрипции в ядрах кэпируется приблизительно 10% транскриптов, синтезируемых РНК-полимеразой II [35].

5. Анализ специфических РНК-транскриптов

5.1. Очистка РНК-транскриптов

Одна из главных трудностей, встречающихся при использовании изолированных ядер как системы транскрипции, состоит в отделении РПК, транскрибированной in vitro, от эндогенной РНК, имеющейся в ядрах в большом избытке (правда, специфические РНК-транскрипты можно идентифицировать с помощью гибридизации нуклеиновых кислот). В частности, желательно отделить цепи РНК, инициированные in vitro, от цепей, которые были просто элонгированы. Для решения этой задачи было разработано несколько методик, позволяющих физически отделить РНК, транскрибированную in vitro, от эндогенной РНК. Такое разделение полезно при двух условиях: а) когда

анализируют меченый ДНК-зонд, а не меченую РНК, например при картировании с помощью нуклеазы S1 (гл. 5, разд. 5.2); б) когда гибридизации мешают большие количества эндогенной РНК, например в случае рРНК или мяРНК.

В исследованиях транскрипции на изолированном хроматине с использованием экзогенной РНК-полимеразы основная сложность связана с возможностью РНК-зависимого синтеза РНК (гл. 5). Но такой синтез не идет в изолированных ядрах, в которых для транскрипции используется эндогенная РНК-полимераза, и поэтому любые выделенные в данном случае РНК-транскрипты должны быть продуктами транскрипции аутентичного гена. Тем не менее всегда следует проверять, что наблюдаемое включение — это результат транскрипции, применяя α-аманитин (для РНК-полимераз II и III) (разд. 3.2) или актиномицин D (25 мкг/мл) для РНК-полимеразы I.

5.1.1. Использование меркурированных нуклеозидтрифосфатов

Показано [37], что 5-меркурированный UTP (Hg-UTP) можно использовать в качестве субстрата для синтеза РНК РНК-полимеразой *Escherichia coli*. Поскольку РНК, содержащая ртуть (Hg-РНК), подобно другим ртутьорганическим производным, обладает высоким сродством к меркаптанам, фракционирование на аффинной колонке с агарозой, содержащей сульфгидрильные группы (например, Bio-Rad Affi-Gel 501), позволяет отделить новосинтезированную Hg-РНК от эндогенной РНК.

Условия транскрипции in vitro с использованием Hg-UTP аналогичны условиям, описанным в табл. 5, за исключением того, что в первом случае в состав буфера для хранения ядер входит 12 мМ 2-меркаптоэтанол вместо ДТТ (табл. 1). После синтеза новообразованную Hg-РНК прогревают и затем хроматографируют на тиолированной сефарозе (табл. 6, гл. 5) при 55—60 °С. Повышенная температура необходима для достижения оптимального отделения Hg-РНК от эндогенной РНК. Этот метод обладает рядом недостатков. При использовании в качестве субстрата Hg-UTP, даже если Hg-группа блокирована 2-меркаптоэтанолом, скорость синтеза РНК в ядрах уменьшается на 30—35%, а длина цепи Hg-РНК короче по сравнению с РНК, не содержащей замещенных нуклеотидов [37]. Тем не менее мы использовали этот метод, чтобы показать, что в ядрах, выделенных из клеток миеломы, сохраняются характерные особенности регуляции синтеза мРНК, кодирующей легкую κ-цепь иммуноглобулина. В ядрах клеточной линии 66.2 миеломы мыши, продуцирующей κ-цепь, in vitro траскрибируется РНК, содержащая 0,02% мРНК для κ-цепи. Ядра клеточной линии МОРС 315, продуцирующей легкие λ-цепи, синтезируют

менее 0,0008% мРНК $\varkappa$-цепи. В дальнейшем этот метод с успехом использовали при анализе транскрипции глобиновых [38], овальбуминовых [39] и вирусных генов [40].

5.1.2. Использование α-тионуклеозидтрифосфатов

В последнее время при исследовании транскрипции, если требовалось отделить новосинтезированную РНК от эндогенной РНК, мы использовали вместо Hg-UTP [α-S]-рибонуклеозидтрифосфаты [26]. Условия транскрипции in vitro в этом случае были аналогичны условиям, описанным в табл. 5. Скорость синтеза серусодержащей РНК в ядрах миеломы линейно зависит от времени на протяжении по крайней мере 1 ч, и, как показывает электрофорез в геле в денатурирующих условиях, РНК, транскрибированная в присутствии 5 мкМ [α-^{35}S]-ATP, идентична РНК, транскрибированной в присутствии 5 мкМ ATP плюс [α-^{32}P]-нуклеотиды. [α-^{35}S]-ATP можно использовать как единственный меченый предшественник для получения [α-^{35}S]-РНК или в сочетании с [α-^{32}P]-GTP для получения [^{32}P]-РНК, содержащей серу.

Новосинтезированную серусодержащую РНК (α-S-РНК) отделяют от эндогенной РНК с помощью аффинной хроматографии на ртутьорганическом носителе типа Hg-целлюлозы или Hg-агарозы. Приготовление таких носителей описано выше в этой главе (разд. 4.3.2). Выделение γ-S-РНК методом хроматографии на Hg-целлюлозе или Hg-агарозе описано в табл. 10, *Б*. Однако, в отличие от γ-S-РНК (табл. 10, Б), α-S-РНК плохо связывается с Hg-целлюлозой при pH 7,9 и гораздо лучше при pH 4,9. Поэтому разделение проводят в буфере, имеющем следующий состав: 0,1 М NaCl, 40 мМ ЭДТА, 0,1%-ный ДСН, 50 мМ ацетат натрия, pH 4,9. Чтобы при этом pH разделение было эффективным, содержание ртути в Hg-целлюлозе не должно превышать 10 мкмолей Hg/г целлюлозы, поскольку при более высоком содержании ртути имеет место значительное неспецифическое связывание. Требование низкого содержания ртути ограничивает использование этого носителя фракционированием относительно малых количеств серусодержащих РНК. Никакой зависимости связывания РНК с Hg-целлюлозой от размеров РНК не обнаружено; достаточно большая α-S-РНК, имеющая коэффициент седиментации 45 S, снимается с этого носителя с выходом ~75%.

5.2. Количественная оценка специфических РНК-транскриптов

Количество синтезированной РНК данного типа можно определить методом гибридизации РНК—ДНК. Используемая ДНК-зонд является или двухцепочечной ДНК, клонированной

Таблица 14. Количественная оценка РНК по гибридизации с иммобилизованной ДНК

1. Если необходимо (разд. 5.2), переведите ДНК-зонд в линейную форму, обработав ее соответствующей рестриктазой.
2. Экстрагируйте ДНК фенолом, насыщенным 50 мМ трис-HCl, pH 8,0.
3. Добавьте 2,5 объема абсолютного этанола и осадите ДНК при —70 °С (1 ч) или при —20 °С (16 ч).
4. Осадите ДНК центрифугированием (10 000*g*, 10 мин, 4 °С) и промойте осадок охлажденным во льду 70%-ным этанолом.
5. Высушите осадок ДНК под вакуумом.
6. Растворите ДНК в 0,2 М NH_4OH, 2,0 М NaCl до конечной концентрации 50 мкг/мл.
7. Денатурируйте ДНК кипячением в течение 2 мин с последующим быстрым охлаждением во льду.
8. Нанесите ДНК на нитроцеллюлозный фильтр (Schleicher and Schuell, BA85), предварительно замоченный в растворе 2×SSC[1]. Это удобнее всего делать, воспользовавшись аппаратом Hybridot (BRL Inc.). С его помощью можно наносить на дот до 100 мкл ДНК (5 мкг). Удобный способ анализа нескольких проб РНК (по нескольким ДНК-зондам) состоит в приготовлении одного ряда дотов с каждым образцом. Затем фильтр можно разрезать на полоски, каждая из которых будет содержать один дот на один ДНК-зонд.
9. Промойте связавшуюся ДНК 50 мкл раствора 2×SSC, пропуская его через каждую лунку Hybridot.
10. Прогрейте фильтры при 80 °С 2 ч в вакуумном шкафу и затем разрежьте на полоски, готовые к гибридизации.
11. Для уменьшения фоновой радиоактивности, часто связывающейся с фильтром, перед гибридизацией препараты радиоактивной РНК следует очистить от невключившихся меченых нуклеотидов с помощью хроматографии на сефадексе G50 согласно табл. 6, пп. 10 и 11.
12. Объедините фракции, соответствующие свободному объему колонки, добавьте 2,5 объема холодного этанола и оставьте пробу при —70 °С (1 ч) или при —20 °С (16 ч) для выпадения РНК в осадок.
13. Отцентрифугируйте РНК (10 000g, 10 мин, 4 °С) и затем высушите осадок под вакуумом.
14. Проведите предгибридизацию фильтра-полоски при 52 °С 30 мин, запечатав ее в маленький полиэтиленовый пакет (пользуйтесь специальным электрическим прибором для заклеивания пакетов) в 0,5 мл дегазированного буфера для предгибридизации, приготовленного смешиванием:
    0,25 мл деионизованного формамида[2]
    0,125 мл раствора 20×SSC
    5 мкл 10%-ного ДСН
    5 мкл 0,1 М ЭДТА, pH 7,5
    5 мкл 1,0 М трис-HCl, pH 7,5
    10 мкл poly(A) (Miles) с концентрацией 0,5 мкг/мл
    20 мкл 100×раствор Денхардта[3]
    5 мкл денатурированной ДНК *E. coli* (1 мг/мл)
    75 мкл H_2O.
15. После предгибридизации осторожно вскройте пакет и слейте буфер. Растворите РНК (п. 13) в 75 мкл воды и смешайте этот раствор с компонентами, перечисленными в п. 14, исключая воду. Перенесите раствор РНК в пакет и вновь запечатайте его, удалив пузырьки воздуха. Инкубируйте при 52 °С 72 ч.
16. После гибридизации вскройте пакет и положите фильтр в ванночку с 20 мл раствора 5×SSC, 0,1%-ного ДСН, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl,

pH 7,5. Осторожно покачивайте фильтр 30 мин при 52 °С. Повторите эту промывку четыре раза.

17. *Вариант 1*

Промойте фильтр 1 раз 20 мл раствора 0,1×SSC при комнатной температуре. Если требуются более строгие условия отмывки, проводите ее при более высокой температуре (до 65 °С).

Вариант 2

Чтобы свести к минимуму неспецифическое связывание РНК с фильтром, проинкубируйте фильтр с 10 мкг/мл РНКазы А в 0,3 М NaCl 10 мин при 37 °С. Затем промойте фильтр 20 мл 0,3 М NaCl при 25 °С.

18. Высушите фильтр на воздухе и затем сделайте радиоавтограф, используя, если необходимо, усиливающий экран из вольфрамата кальция.

19. Чтобы оценить количество РПК, связанное с каждым дотом ДНК, нужно:

Вариант 1: просканировать радиоавтографическое изображение дота, используя денситометр, предварительно откалибровав потемнение пленки под действием известного количества этого же радионуклида.

Вариант 2: вырезать каждый дот из полоски фильтра и определить радиоактивность на сцинтилляционном счетчике. В этом случае, чтобы вычислить фон, нужно просчитать участок фильтра, по размерам соответствующий доту, но не содержащий связанной ДНК. Можно также определить количество радиоактивной РНК, связавшейся с дотом негомологичной ДНК (например, pBR322).

---

[1] Состав раствора 1×SSC: 0,15 М NaCl, 15 мМ цитрат (тринатриевая соль).

[2] Формамид деионизуйте следующим образом: 100 мл формамида встряхивайте со 100 г смешанной смолы [например, Bio-Rad AG501-X8(D)] 2 ч при комнатной температуре. Отфильтруйте смолу и храните формамид при —20 °С.

[3] Состав раствора Денхардта 100-кратной концентрации: 10% безнуклеазного БСА (например, фирмы BRL), 10% поливинилпирролидона, 10% фикола (мол. масса 400 000). Если гибридизовавшуюся РНК в дальнейшем элюируют с фильтра, то БСА не добавляют (табл. 15).

в плазмиде, или одноцепочечной ДНК, клонированной в колифаге М13. Наиболее удобный метод заключается в иммобилизации ДНК-зонда на нитроцеллюлозном фильтре в виде серии дотов (каждый диаметром ~0,5 см). Затем фильтр инкубируют в растворе, содержащем меченые РНК-транскрипты, где происходит гибридизация. После отмывки для удаления негибридизовавшейся РНК количество гибридизующейся РНК можно определить или путем радиоавтографии с последующей денситометрией фотоизображения, или путем вырезания дотов и подсчета их радиоактивности в жидкостно-сцинтилляционном счетчике. Данная методика описана в табл. 14, однако некоторые моменты требуют дальнейшего обсуждения.

1. ДНК-зонд удобнее всего наносить на нитроцеллюлозный фильтр, пользуясь имеющимся в продаже аппаратом, который позволяет наносить одновременно много проб на один фильтр (обычно 96 проб на лист нитроцеллюлозы с форматом обычной панели для микротитрования 8×12 см). Например, в аппарате Hybridot фирмы BRL Inc (табл. 14), в котором используется фильтрование под вакуумом, ДНК связывается с фильтром по мере прохождения через него пробы. Поскольку сверхспиральная плазмидная ДНК не связывается с нитроцеллюлозой,

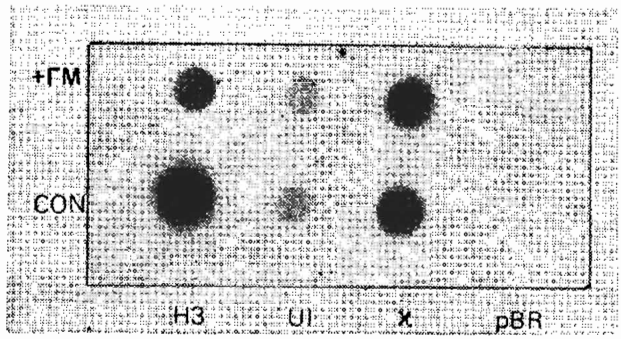


Рис. 4. Гибридизация меченой РНК с ДНК-дотами. Ядра выделены из экспоненциально растущих клеток миеломы (CON) или из клеток, обработанных в течение 1 ч 5 мМ гидроксимочевиной (ГМ). Транскрипцию in vitro проводили с меченым радиоактивным предшественником [α-^{32}P]-GTP. Для каждой гибридизации с дотами различных ДНК-зондов использовали равные количества РНК ($4 \cdot 10^6$ имп/мин). Н3 — ген Н3 мыши, U1 — ген U1 РНК мыши, κ — ген легкой κ-цепи иммуноглобина мыши и pBR — плазмида pBR322. Фильтры промывали и гибридизовавшуюся РНК выявляли с помощью радиоавтографии.

прежде чем использовать эту ДНК в качестве зонда, ее следует перевести в линейную форму с помощью рестриктазы.

2. Чтобы была гарантия количественного связывания с нитроцеллюлозным фильтром, ДНК-зонд должна иметь размеры минимум 1,0 kb.
3. Перед гибридизацией из препарата РНК нужно удалить методом гель-фильтрации все [^{32}P]-нуклеотиды. Если этого не сделать, то на радиоавтографах появляется неровный крапчатый фон.
4. В условиях гибридизации, описанных в табл. 14, плазмидную ДНК обычно берут в избытке (за исключением генов структурных РНК, имеющихся в ядре в больших количествах, например рРНК и мяРНК), чтобы гибридизация была количественной. Это проверяют с помощью трех экспериментов:
   а) Варьируют количество вносимой РНК; количество гибридизующейся РНК должно быть пропорционально внесенной РНК.
   б) Варьируют количество ДНК на фильтре. Это не должно влиять на количество гибридизующейся РНК, если ДНК берут в избытке.
   в) Повторно гибридизуют РНК, которая не связалась с фильтром, с той же ДНК; гибридизации не должно быть.
5. В качестве контрольной ДНК для учета неспецифического связывания РНК нужно использовать плазмидную ДНК, не несущую изучаемой последовательности ДНК. Обычно фон

составляет 0,0001—0,001% внесенной радиоактивности. Чтобы снизить его и убрать фрагменты РНК, не обладающие полной комплементарностью к ДНК-зонду, фильтры обрабатывают РНКазой А (10 мкг/мл) или РНКазой Т1 (10 ед./мл) в 0,3 М NaCl 10 мин при 37 °С с последующим промыванием в 0,3 М NaCl (табл. 14, п. 17), высушивают и радиоавтографируют.

Пример использования дот-гибридизации приведен на рис. 4.

5.3. Определение размеров специфических РНК-транскриптов

Для определения размеров специфической РНК, синтезированной in vitro, используют два подхода:

1. Гибридизуют РНК со специфической клонированной ДНК, гибридизовавшуюся РНК элюируют и затем определяют ее размеры или
2. РНК фракционируют по размерам перед гибридизацией.

Второй подход, вероятно, более удобен для анализа больших РНК-транскриптов, которые во время гибридизации могут деградировать.

5.3.1. Гибридизация перед определением размеров

Чтобы определить размеры полного РНК-транскрипта, РНК, которая гибридизовалась с клонированной ДНК, иммобилизованной на нитроцеллюлозном фильтре, элюируют и затем анализируют методом электрофореза в полиакриламидном геле (молекулы РНК с размерами менее 500 нуклеотидов) или в агарозном геле (для РНК бо́льших размеров). Этот метод описан в табл. 15, *А*.

В одном из вариантов этого метода иммобилизованные гибриды ДНК — РНК обрабатывают РНКазой Т1, которая отщепляет части молекулы РНК, лежащие за пределами последовательностей, представленных в клонированной ДНК. РНКаза Т1 эффективно удаляется промыванием фильтров раствором ДСН перед элюцией РНК (табл. 15, *Б*). В примере на рис. 5 интактную N1-РНК морского ежа гибридизовали с нанесенной на фильтр ДНК, представляющей собой одну половину гена N1. После расщепления РНКазой Т1 длина РНК уменьшилась до половины в соответствии с размером комплементарного фрагмента ДНК. Этот метод очень помогает в следующем случае. Известно, что клонированные кДНК связывают новообразованные РНК, содержащие вставочные последовательности, но при обработке РНКазой вставочные последовательности деградируют, и при этом образуются фрагменты РНК, имеющие размеры

Таблица 15. Элюция гибридизовавшейся РНК с иммобилизованной ДНК

А. Стандартный метод

1. Если нитроцеллюлозный фильтр уже использовали раньше для счета радиоактивности в жидком сцинтилляторе (табл. 14, п. 20), то сначала промойте его хлороформом.
2. Высушите каждый фильтр на воздухе и затем поместите его в микроцентрифужную пробирку. Добавьте 75 мкл 98%-ного формамида (деионизованного)[1], 0,2%-ного ДСН и дрожжевой тРНК[2] (10 мкг/мл).
3. Инкубируйте фильтры при 60 °С 10 мин и затем отберите раствор, содержащий элюированную РНК.
4. Элюируйте фильтры еще один раз согласно пп. 2 и 3 и объедините оба элюата.
5. К объединенным элюатам добавьте 0,2 мл 0,6 М NaCl и затем 1,0 мл абсолютного этанола. Оставьте раствор при —70 °С на 30 мин.
6. Отцентрифугируйте при 10 000g 10 мин при 4 °С, чтобы осадить РНК.

Б. Элюция после расщепления РНКазой Т1[3]

1. Если необходимо, удалите с фильтра загрязнения сцинтилляционной жидкостью согласно п. 1 разд. А (выше).
2. Каждый высушенный фильтр проинкубируйте в 100 мкл 50 мМ ацетата натрия, pH 5,5, содержащего 10 ед. РНКазы Т1, при 37 °С 10 мин.
3. Промойте каждый фильтр три раза 100 мкл 0,1%-ного ДСН, 2×SSC[4] (по 10 мин) для инактивации остатков РНКазы Т1.
4. Элюируйте устойчивую к РНКазе РНК, как описано в пп. 2—6 разд. А (выше).

[1] Формамид деионизуйте, как описано в сноске 2 табл. 14.

[2] По-другому РНК можно элюировать, прогревая каждый фильтр в 100 мкл раствора дрожжевой тРНК в воде (10 мкг/мл) при 100 °С 2 мин. При обоих вариантах элюции получают почти идентичные результаты.

[3] РНКазу А нельзя использовать вместо РНКазы Т1, поскольку она не полностью инактивируется при промывке.

[4] См. табл. 14, сноска 1.

экзонов, из которых состоит кДНК. Таким образом, анализ РНК-транскриптов с обработкой РНКазой Т1 или без нее дает информацию как относительно размеров новообразованного РНК-транскрипта, так и относительно размеров экзонов в соответствующем гене.

5.3.2. Определение размеров перед гибридизацией

Методика Шиблера и др. [42] позволяет гибридизовать фракции агарозного геля непосредственно с ДНК-дотами (табл. 16). РНК фракционируют в 0,8%-ном агарозном геле при денатурирующих условиях с формальдегидом [43], глиоксалем [17] или метилртутьгидроксидом [44]. Затем гель разрезают на небольшие кусочки и каждый кусочек растворяют в 0,6 М перхлорате натрия. Раствор наносят прямо на фильтры, содержащие иммобилизованную клонированную ДНК, и количество гибридизующегося материала измеряют стандартным методом. Это позволяет точно определять размеры транскрип-

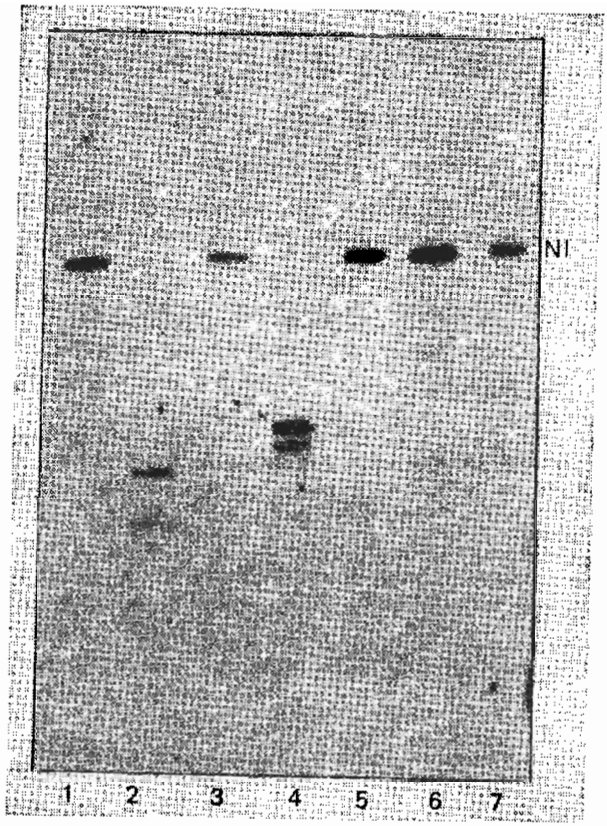


Рис. 5. Определение размеров РНК-транскриптов. ДНК-зондом служила плазмида, содержащая ген для малой ядерной N1 РНК морского ежа [6] с длиной 163 нуклеотида. Рестриктаза *Ava*I разрезает ген в положении 116, а рестриктаза *Hinf*I — в положении 87. Плазмиды, содержащие интактный ген или ген, расщепленный ферментами *Ava*I или *Hinf*I, были иммобилизованы на нитроцеллюлозе. Фильтры инкубировали с [^{32}P]-РНК, транскрибированной in vitro в ядрах морского ежа. С каждой плазмидной ДНК-зондом было проанализировано по два фильтра. С одного из этих фильтров РНК элюировали сразу, а другой фильтр перед элюцией РНК обрабатывали РНКазой Т1. Элюированную РНК проанализировали методом электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле в 7,0 М мочевине. Дорожка 1 — необработанная РНК, элюированная с нерасщепленной N1-ДНК; дорожка 2 — РНК, которая была связана с N1-ДНК, расщепленной *Hinf*I, и обработана перед элюцией РНКазой Т1; дорожка 3 — РНК, которая была связана с N1-ДНК, расщепленной *Hinf*I и элюирована без предварительной обработки РНКазой; дорожка 4 — РНК, которая была связана с N1-ДНК, расщепленной *Ava*I, и обработана РНКазой Т1 перед элюцией; дорожка 5 — РНК, которая была связана с N1-ДНК, расщепленной *Ava*I, и элюирована без предварительной РНКазной обработки; дорожка 6 — то же, что дорожка 1; дорожка 7 — РНК, которая была связана с нерасщепленной N1-ДНК, но затем перед элюцией обработана РНКазой Т1. В *Hinf*I-гидролизате (дорожка 2) есть полосы, соответствующие 5′-концевой части (90 нуклеотидов) и 3′-концевой части (75 нуклеотидов). В *Ava*I-гидролизате (дорожка 4) видны две полосы, соответствующие фрагментам приблизительно по 120 нуклеотидов; оба они относятся к 5′-концевой части последовательности. Наличие *двух* полос может быть связано с гетерогенностью разрезания РНКазой Т1. 3′-концевой фрагмент уже вышел из геля.

Таблица 16. Определение размеров РНК перед гибридизацией [42]

Этот метод заключается во фракционировании РНК методом электрофореза в денатурирующих условиях при использовании метилртутьгидроксида с последующей гибридизацией элюатов из кусочков геля для локализации исследуемой РНК.

Внимание: метилртутьгидроксид чрезвычайно токсичен, и поэтому все этапы, на которых применяется этот реагент, должны проводиться в вытяжном шкафу с хорошей тягой.

1. Приготовьте 1%-ный агарозный гель в 7,5 мМ метилртутьгидроксиде, 50 мМ борной кислоте, 10 мМ сульфате натрия, 1 мМ ЭДТА, pH 8,3. Проведите электрофорез радиоактивной РНК, используя буфер приведенного выше состава (но без метилртутьгидроксида), как описано в работе [44].
2. После электрофореза разрежьте гель на кусочки размером 1—2 мм. Растворите каждый кусочек в небольшом объеме раствора: 2 М перхлорат натрия, 0,1%-ный ДСН, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 4-кратный раствор Денхардта[1], 0,25 мг/мл дрожжевой тРНК, 50 мМ трис-HCl, pH 7,4, и инкубируйте пробы при 68 °С 2 ч.
3. Отберите по аликвоте из каждой пробы и определите ее суммарную радиоактивность на сцинтилляционном счетчике.
4. Приготовьте нитроцеллюлозные фильтры (Schleicher and Schuell, BA85, диаметром 0,9 см), на каждом из которых было заранее иммобилизовано (табл. 14) по 5 мкг ДНК-зонда для изучаемой РНК. Поместите один фильтр в каждую пробу РНК и покройте раствор слоем парафинового масла. Гибридизуйте при 65 °С 18 ч.
5. После гибридизации промойте фильтры при 68 °С 1 ч раствором, в состав которого входят: 2 М перхлорат натрия, 0,1%-ный ДСН, 20 мМ трис-HCl, pH 7,4, затем промойте раствором 0,1%-ного ДСН+2×SSC[2] при 68 °С 1 ч и затем раствором 2×SSC при комнатной температуре 1 ч. Каждый раз используйте 10 мл промывочного буфера на 1 фильтр.
6. Промойте фильтры раствором 0,1×SSC при комнатной температуре 15 мин. В другом варианте можно обработать фильтры РНКазой для снижения фонового связывания РНК с фильтром согласно табл. 14, п. 17.
7. Оцените количество гибридизовавшейся меченой РНК по радиоактивности, измеренной на сцинтилляционном счетчике (табл. 14, п. 19).

[1] Состав раствора Денхардта приводится в сноске 3 к табл. 14.
[2] См. табл. 14, сноска 1.

тов, содержащих специфические последовательности. Данный метод предпочтительно применять при анализе больших РНК-транскриптов.

5.4. Определение концов РНК-транскриптов

При изучении синтеза РНК in vitro важно ответить на вопросы, являются ли места начала и окончания синтеза РНК in vitro уникальными и как они связаны с сайтами инициации и терминации синтеза РНК in vivo. Ответы на эти вопросы можно получить, пользуясь методами, описанными ниже. Для этого из клонированной геномной ДНК выделяют специфические субклонированные фрагменты, содержащие 5′- или 3′-конец гена, переносят их на нитроцеллюлозу, гибридизуют с мечеными РНК-транскриптами и гибриды обрабатывают РНКазой

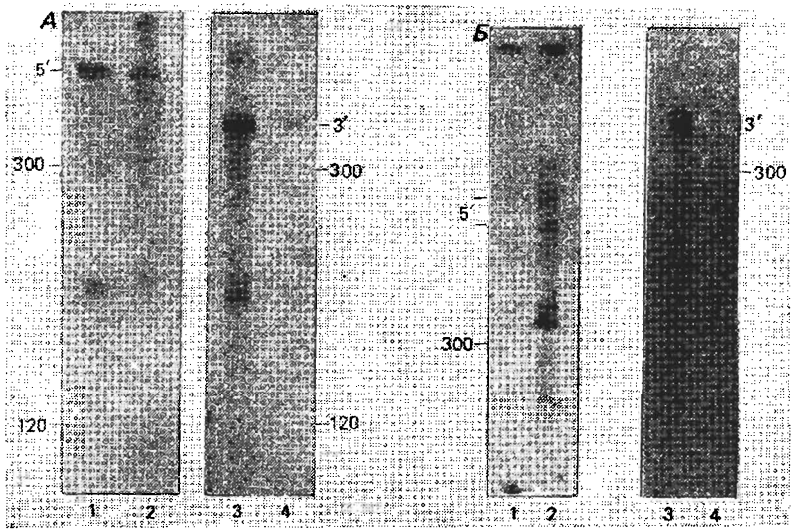


Рис. 6. Концы РНК-транскриптов генов рРНК в ядрах зародышей морского ежа. *А*. Ядра, выделенные из зародышей *Lytechinus variegatus* на стадии бластулы, инкубировали с [α-^{32}P]-GTP. Меченую РНК гибридизовали с клонированной ДНК, содержащей 500 bp с 5′-конца гена рРНК или 500 bp с 3′-конца гена рРНК. В параллельном эксперименте РНК, меченную in vivo $^{32}PO_4$, гибридизовали с такими же ДНК. Гибриды обрабатывали РНКазой Т1, после чего РНК элюировали и анализировали с помощью электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле. Указаны положения маркеров 7S-РНК (300 нуклеотидов) и 5S-РНК (120 нуклеотидов). Дорожка 1 — синтезированная in vitro РНК, гибридизованная с 5′-фрагментом гена; дорожка 2 — синтезированная in vivo РНК, гибридизованная с 5′-фрагментом гена; дорожка 3 — синтезированная in vitro РНК, гибридизованная с 3′-фрагментом гена; дорожка 4 — синтезированная in vivo РНК, гибридизованная с 3′-фрагментом гена. В случае 5′-фрагмента имеются несколько полос (д. 2). Неизвестно, обусловлено ли это гетерогенностью разрезания РНКазой Т1 или наличием различных сайтов инициации. Точно так же неизвестно происхождение дуплета на дорожке 3. *Б*. РНК, синтезированную in vitro, гибридизовали с разделенными цепями ДНК, клонированной в колифаге М13. Гибриды обрабатывали РНКазой Т1 и анализировали или в 6%-ном полиакриламидном геле (дорожки 1 и 2), или в 10%-ном полиакриламидном геле (дорожки 3 и 4). В каждом случае указано положение маркера 7S-РНК (300 нуклеотидов). На дорожки 1—4 наносили пробы с РНК, которую гибридизовали соответственно с 5′-концом некодирующей цепи, 5′-концом кодирующей цепи, 3′-концом кодирующей цепи и 3′-концом некодирующей цепи.

Т1. Затем РНК элюируют и анализируют путем электрофореза в геле. Если выбраны небольшие клонированные фрагменты, то защищенные РНК-фрагменты малы, даже если они входили в большие транскрипты, и их размеры могут быть определены точно. При известной последовательности ДНК можно опреде-

лить концы РНК, транскрибированной in vitro. Пример такого анализа для генов рРНК *Lytechinus variegatus* приведен на рис. 6. На рис. 6, *А* сравниваются концы рРНК, синтезированной в изолированных ядрах зародышей на стадии бластулы, с концами РНК, синтезированной in vivo. На рис. 6, *Б* показано, что РНК, синтезируемая in vitro, копируется только со смысловой цепи ДНК. Фрагменты, соответствующие 5′- или 3′-областям гена, были субклонированы в колифаге M13. Различные ДНК (четыре клона, каждый из которых содержал одну цепь одного из концов) гибридизовали с РНК-транскриптами и затем определяли длину связавшейся РНК. Следует отметить, что это позволяет также определить уровень транскрипции в 5′- и 3′-областях и таким образом оценить количество законченных цепей РНК, которые метятся преимущественно по 3′-концу в отличие от транскрипции de novo, при которой метятся оба конца. В приведенном примере (рис. 6) 300 нуклеотидов на 5′-конце транскрипта размером 8 kb метятся довольно сильно. Это заставляет предполагать, что имеет место инициация синтеза РНК.

6. Применение систем ядерной транскрипции

Транскрипция в изолированных ядрах — один из лучших методов, позволяющих ответить на ряд важных вопросов. До сих пор наиболее плодотворными были эксперименты, в которых определяли относительные скорости транскрипции гена и структуру первичного транскрипта. Систему транскрипции в изолированных ядрах можно использовать также для выявления регуляторных факторов и факторов, необходимых для процессинга РНК.

6.1. Измерение относительной скорости транскрипции гена

Относительную скорость транскрипции данного гена (относительно транскрипции других генов) можно определить путем измерения количества РНК (синтезированной in vitro), гибридизующейся с избытком ДНК (дот-гибридизация; табл. 14), и сравнивая эту величину с общим количеством синтезированной РНК. В целом 5 мкг ДНК на один дот (табл. 14) обеспечивает значительный избыток ДНК для количественной гибридизации, если только имеют дело не со структурной РНК (например, рРНК или мяРНК). Преимущество данного метода заключается в том, что получаемые данные не искажаются из-за деградации РНК в изолированных ядрах. Однако делается допущение, что скорость транскрипции всех генов in vitro отра-

Таблица 17. Относительная скорость транскрипции гистонового гена

Изолированные ядра

Ядра, выделенные из клеток миеломы мыши в экспоненциальной фазе роста или из клеток, обработанных цитозинарабинозидом (ага-С; 40 мкг/мл), инкубировали с [^{32}P]-GTP в условиях транскрипции in vitro (табл. 5). Меченую РНК ($6{,}4 \cdot 10^6$ имп/мин) каждой партии ядер гибридизовали с дотами различных ДНК-зондов[1], иммобилизованных на нитроцеллюлозных фильтрах (табл. 14), и количество РНК, связывающееся с каждым дотом, определяли по радиоактивности, измеряемой на сцинтилляционном счетчике.

Источник РНК	*ДНК-зонд*[1]			
	H3.2	H2a	κ	pBR322
Контрольные клетки (имп/мин)	1265	1007	680	30
Включение, %	0,020	0,016	0,012	0,0005
Клетки, обработанные ага-С (имп/мин)	226	149	624	25
Часть от контроля, %	21,0	14,8	91,8	—

Клетки, меченные in vivo импульсной меткой

Культуры клеток (несколько параллельных проб) были импульсно мечены [^{3}H]-уридином 10 мин и количество меченой РНК, гибридизовавшейся с различными ДНК-зондами, было определено, как описано выше.

Источник РНК	ДНК-зонд[1]			
	H3.2	H2a	κ	pBR322
Контрольные клетки (имп/мин)	1137	976	2244	40
Включение, %	0,016	0,014	0,032	0,0006
Клетки, обработанные ага-С (имп/мин)	200	170	1847	35
Часть от контроля, %	17,6	17,4	85,0	—

[1] Использованные ДНК-зонды: H3.2 — ген гистона H3 мыши [45]; H2a — ген гистона H2a мыши [45]; κ — ген легкой цепи иммуноглобулина [42], pBR322 — плазмида (контроль).

жает активность in vivo. Не исключено, что это неверно для малых транскриптов, которые могут неэффективно инициироваться, в то время как большие транскрипты элонгируются после инициации in vivo. В таком случае большие транскрипты будут составлять бо́льшую долю РНК, меченой in vitro, по сравнению с их долей после импульсного мечения in vivo. Чтобы скомпенсировать это, транскрипцию следует проводить в течение короткого времени (5 мин), когда бо́льшая часть транскрипции должна отражать элонгацию уже инициированных РНК, и сравнивать результаты с транскрипцией при более длительных периодах инкубации (30 или 60 мин), когда различия в эффективности инициации разных генов должны быть более

выраженными. Относительные скорости транскрипции гена измеряют для каждого периода времени. Если относительные скорости транскрипции не зависят от продолжительности инкубации, то измеряемая скорость, вероятно, является точным отражением скорости транскрипции in vivo. В табл. 17 [45] показано применение этого метода для измерения изменений, происходящих при транскрипции гистонового гена. Относительные скорости транскрипции in vitro хорошо согласуются с соответствующими скоростями in vivo, определяемыми путем импульсного мечения клеток в течение 5 мин [^{3}H]-уридином (табл. 17). В этом опыте доля РНК, приходящаяся на гистоновую мРНК, не зависит от длительности периода транскрипции, несмотря на то, что эти транскрипты содержат лишь 500 нуклеотидов. Отсюда следует, что гистоновые гены либо эффективно инициируются in vitro, либо определенное число молекул РНК-полимеразы II уже ассоциировано с этими генами in vivo и они начинают транскрипцию в разные моменты во время инкубации in vitro.

6.2. Что такое первичный транскрипт

Благодаря низкому уровню деградации РНК в системе с ядрами, выделенными из клеток многих типов, существует возможность выявлять первичные транскрипты, которые из-за быстрого процессинга РНК, особенно по 3′-концу, трудно обнаружить in vivo. Однако in vitro терминация не всегда идет правильно. Чтобы показать, что транскрипты, наблюдаемые in vitro, существуют и in vivo, ядра клеток, экспрессирующих глобиновые гены, метили в течение 1 мин [^{32}P]-GTP [46, 47]. Затем РНК-транскрипты гибридизовали с фрагментом геномной ДНК, локализованным на расстоянии 1 kb от 3′-конца глобинового гена в направлении транскрипции. Поскольку РНК-полимераза II способна транскрибировать in vitro только со скоростью 300 нуклеотидов/мин [18], любая меченая РНК, комплементарная области, выходящей за пределы 500 оснований от 3′-конца гена, должна относиться к транскриптам, инициированным in vivo и распространившимся в эту область in vitro. По-видимому, первичный глобиновый транскрипт продолжается за пределы последнего экзона глобиновой мРНК. 3′-Область первичного транскрипта можно определить, используя 1-минутный период мечения для транскрипции in vitro на изолированных ядрах и применяя соответствующие зонды для 3′-конца гена. Четко показать, что эти 3′-последовательности транскрибируются in vivo, не удалось, по-видимому, из-за того, что они быстро деградируют [47].

6.3. Выделение и изучение первичных транскриптов

В этом разделе описан метод выделения первичных РНК-транскриптов после их инициации в присутствии [γ-S]-рибонуклеозидтрифосфата. Его можно использовать для идентификации и выделения транскриптов, начинающихся с определенного нуклеотида. Выделенные транскрипты можно секвенировать и выявить точные сайты инициации в пределах клонированного фрагмента ДНК.

Транскрипцию проводят, инкубируя ядра в условиях, описанных в табл. 5 или 10, используя в качестве меченого нуклеозидтрифосфата [γ-^{35}S]-ATP или [γ-^{35}S]-GTP (New England Nuclear). Включение [γ-^{35}S]-нуклеотида в 5′-конец РНК-транскрипта можно показать способом, описанным в сноске 2 к табл. 10. [γ-^{35}S]-РНК-транскрипты гибридизуют с соответствующей изучаемому гену клонированной ДНК-зондом, которая нанесена на нитроцеллюлозный фильтр (табл. 14). После гибридизации связавшуюся РНК элюируют (табл. 15) и расщепляют ферментами по специфическим основаниям (подробности метода см. в разд. 7 ссылки [48]). 5′-[γ-^{35}S]-Олигонуклеотиды отделяют от олигонуклеотидов, образовавшихся при расщеплении по внутренним сайтам, методом электрофореза в полиакриламидном геле, приготовленном с использованием *n*-акриламидофенилртути в качестве мономера [41]. Серусодержащие 5′-олигонуклеотиды связываются с меркурированным гелем, в то время как олигонуклеотиды, образовавшиеся при разрезании по внутренним сайтам, мигрируют через него. Связавшиеся олигонуклеотиды можно элюировать с геля, если продолжить электрофорез в буфере, содержащем отрицательно заряженное тиольное соединение. Эти олигонуклеотиды содержат последовательность [^{35}S]-pppXp, но имеют разную длину в зависимости от локализации расщепляемой связи. Поэтому после электрофореза образуется набор из фрагментов разной длины («лестница»), которые выявляют с помощью радиоавтографии. Последовательность РНК на 5′-конце транскрипта определяют по этой «лестнице», как делают при использовании ДНК-секвенирующих гелей. В действительности этот метод эффективен даже без элиминации внутренних олигонуклеотидов, поскольку они не мечены и не обнаруживаются на радиоавтографах. Поэтому можно определить последовательность на 5′-конце первичного транскрипта простым анализом продуктов ферментативного расщепления (см. выше) на обычном секвенирующем геле [48]. Сравнивая эту последовательность РНК с последовательностью гена, с которого получены транскрипты, можно точно картировать сайты начала транскрипции при инициации in vitro.

Чтобы продемонстрировать эффективность γ-тионуклеотидов как индикаторов инициации, мы выделили синтезированные in vitro РНК-транскрипты, кодируемые ДНК фага λCb_2. Транскрипты, начинающиеся с A или G, были отобраны с использованием соответственно [γ-S]-ATP или [γ-S]-GTP [49]. При замене ATP или GTP на соответствующие γ-тионуклеотиды относительная эффективность транскрипции не изменялась и ошибки считывания не выявлялись [49]. Такой же принцип можно использовать для выделения РНК-транскриптов, специфически начинающихся с A или G при синтезе в изолированных ядрах. Кроме того, поскольку сейчас имеются пиримидиновые аналоги [γ-S]-UTP и [γ-S]-CTP, с их помощью можно проверить, могут ли эукариотические РНК-полимеразы использовать пиримидиновые нуклеотиды для инициации синтеза цепей РНК вместо ATP или GTP.

6.4. Изучение посттранскрипционных модификаций

Ядра, выделенные из культивируемых клеток по методу, описанному в разд. 2.2, не способны осуществлять процессинг, полиаденилирование и метилирование РНК, но их можно использовать для получения первичных транскриптов, не имеющих кэпов. Таким образом, эта система представляет собой как бы исходную точку для воссоздания процесса созревания РНК.

6.4.1. Полиаденилирование

В изолированных ядрах идет лишь слабое полиаденилирование транскриптов, синтезируемых РНК-полимеразой II, которое можно усилить, добавив клеточный или ядерный экстракты [50]. Получение подходящих экстрактов описано в табл. 18.

Транскрипцию проводят обычным способом в присутствии [α-^{32}P]-GTP (табл. 5), добавляя в каждую реакционную смесь 80 мкл клеточного или ядерного экстракта. Концентрации солей и других компонентов доводят до значений, соответствующих стандартной реакционной смеси для транскрипции (табл. 5, п. 1). После транскрипции РНК выделяют обычным способом (табл. 6) и затем полиаденилированные транскрипты идентифицируют методом хроматографии на poly (U)-сефарозе с элюцией градиентом формамида [50] (табл. 19). Poly (U)-сефароза позволяет разделять РНК по длинам их poly (A)-участков, в то время как oligo (dT)-целлюлоза связывает все полиаденилированные РНК одинаково независимо от длины poly (A). Таким образом, хроматография на poly(U)-сефарозе дает возможность различать настоящие poly(A)$^+$-РНК от РНК, содержа-

Таблица 18. Приготовление экстрактов для посттранскрипционной модификации

Получение клеточных экстрактов[1, 2]

1. Отцентрифугируйте клетки (500g, 5 мин, 25 °С) и промойте их два раза 0,14 М NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 7,5.
2. Промойте клетки один раз пятью объемами раствора: 25 мМ KCl, 2 мМ ацетат магния, 1 мМ ДТТ, 10 мМ трис-HCl, pH 7,5.
3. Ресуспендируйте осадок клеток в одном объеме этого буфера (обычно ресуспендируют $5 \cdot 10^8$ клеток в 1 мл буфера) и дайте клеткам набухнуть в течение 5 мин при 4 °С.
4. Лизируйте клетки путем гомогенизации (10 движениями пестика типа «В» в гомогенизаторе Даунса).
5. Доведите концентрацию KCl в гомогенате до 0,35 М, пользуясь 4,0 М KCl.
6. Отцентрифугируйте гомогенат при 10 000g 5 мин, чтобы осадить ядра и митохондрии.
7. Отберите супернатант и отцентрифугируйте его при 100 000g 1 ч при 4 °С.
8. Отберите супернатант и храните его маленькими порциями в жидком азоте. Эти экстракты стабильны минимум 3 мес.

Получение ядерных экстрактов[1, 2]

1. Приготовьте клеточный гомогент, как описано выше (пп. 1—4).
2. Отцентрифугируйте гомогенат при 1000g 3 мин при 4 °С, чтобы осадить ядра.
3. Гомогенизируйте неочищенные ядра в 1 мл 0,35 М KCl, 2 мМ ацетата магния, 1 мМ ДТТ, 10 мМ трис-HCl, pH 7,5. Повышенная концентрация соли вызывает лизис ядер.
4. Приготовьте ядерный экстракт с помощью центрифугирования, как описано в пп. 6—8 первой части этой таблицы. Этот неочищенный ядерный экстракт содержит всю полиаденилирующую и метилирующую активности клеточных экстрактов и не содержит цитоплазматических белков и РНК.

[1] Эндогенные РНК можно удалить путем пропускания свежеприготовленного экстракта через колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (объемом 3 мл), уравновешенную 0,3 М KCl, 2 мМ ацетатом натрия, 1 мМ ДТТ, 10 мМ трис-HCl, pH 7,5. Элюцию с колонки проводят этим же буфером и собирают фракции, содержащие белок, который не задерживается колонкой.

[2] Если требуется, малые молекулы (рибонуклеозидтрифосфаты и соли) можно удалить с помощью хроматографии экстракта на колонке с сефадексом G25 (объемом 10 мл), уравновешенной 10%-ным глицеролом, 0,12 М KCl, 5 мМ ацетатом магния, 1 мМ ДТТ, 10 мМ трис-HCl, pH 7,5. Фракции, соответствующие свободному объему, объединяют и хранят в жидком азоте. Если экстракт не хроматографируют на сефадексе G25, то в нем остается значительное количество рибонуклеозидтрифосфатов, которые снижают удельную активность меченого радиоактивного нуклеозидтрифосфата в последующих экспериментах.

щих случайные полиаденозиновые участки, закодированные в геноме.

Для определения размеров poly (A)-последовательностей полиаденилированных РНК-транскриптов транскрипцию in vitro проводят, используя в качестве предшественника [^{3}H]-АТР или [α^{32}P]-АТР, и длину poly (A) определяют непосредственно путем электрофореза в геле после расщепления остальной части РНК РНКазами А и Т1 (табл. 20).

Наконец, за синтезом poly (A)-последовательности in vitro можно следить, измеряя отношение [^{3}H]-аденозина к [^{3}H]-АМР после гидролиза щелочью [50] (табл. 21). Этим способом

Таблица 19. Выделение полиаденилированной РНК методом хроматографии на poly (U)-сефарозе

1. Растворите пробу РНК (выделенную согласно табл. 6) в буфере для нанесения (0,4 М NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0,5%-ный ДСН, 10 мМ трис-HCl, pH 7,5). Прогрейте при 80 °С 2 мин, чтобы денатурировать РНК, и затем охладите во льду.
2. Нанесите пробу на колонку с poly(U)-сефарозой (объем 1 мл), предварительно уравновешенную буфером для нанесения, при комнатной температуре и соберите несвязавшуюся РНК.
3. Вновь нанесите несвязавшуюся РНК на колонку, как в п. 2. Повторите такое нанесение в общей сложности три раза, добиваясь полного связывания полиаденилированной РНК. Обычно только ~10% общей включившейся радиоактивности связывается с колонкой.
4. Промывайте колонку буфером для нанесения до тех пор, пока РНК не перестанет выходить с колонки (следите по радиоактивности). Затем проведите элюцию с колонки 5%-ным (по объему) формамидом в буфере для элюции (1 мМ ЭДТА, 0,5%-ный ДСН, 10 мМ трис-HCl, pH 7,5). При этом выйдет слабо связавшаяся РНК, содержащая лишь короткие участки oligo(A).
5. Проведите элюцию 10 мл линейного градиента (5—60%) формамида в буфере для элюции. Соберите фракции по 0,5 мл. Полиаденилированная РНК, содержащая 3′-poly(A) размером около 200 остатков, элюируется во фракциях 11—15.
6. Наконец, проведите элюцию 90%-ным формамидом в буфере для элюции. В этой фракции должно элюироваться меньше 0,1% сорбированной радиоактивности.
7. Вновь уравновесьте колонку буфером для нанесения, чтобы подготовить ее к повторному использованию.

Таблица 20. Определение длины poly(A)-последовательностей

1. Инкубируйте ядра в системе транскрипции in vitro, как описано в табл. 5, используя в качестве предшественника 1 мКи/мл [^{3}H]-АТР или [α-^{32}P]-АТР и добавив в инкубационную смесь 80 мкл клеточного или ядерного экстракта. Общая концентрация АТР должна быть 100 мкМ. Концентрацию остальных компонентов доведите до стандартных концентраций обычной транскрипционной смеси (табл. 5, п. 1).
2. Выделите РНК способом, описанным в табл. 6, и затем очистите полиаденилированную РНК методом аффинной хроматографии на poly(U)-сефарозе (табл. 19).
3. Соберите фракции, содержащие полиаденилированные РНК-транскрипты. Добавьте 40 мкг тРНК-носителя, NaCl до концентрации 0,3 М и затем 2,5 объема этанола. Оставьте РНК осаждаться при 20 °С в течение ночи.
4. Осадите РНК центрифугированием (10 000g 15 мин) и затем растворите ее в 50 мкл 0,4 М NaCl, 50 мМ трис-HCl, pH 7,5. Добавьте 0,1 мг РНКазы А и 1 ед. РНКазы Т1 и инкубируйте при 25 °С 30 мин. При этом гидролизуются все последовательности РНК, кроме poly(A)-последовательностей, не подвергающихся гидролизу при высоких концентрациях соли.
5. Проведите хроматографию гидролизата РНК на poly(U)-сефарозе и выделите радиоактивную poly(A) (табл. 19).
6. Добавьте 10 мкг тРНК-носителя к радиоактивной poly(A), NaCl до концентрации 0,3 М и затем 2,5 объема этанола и оставьте смесь на ночь при —20 °С, чтобы poly(A) выпала в осадок.

7. Отцентрифугируйте poly(A) при 10 000g 15 мин.
8. Определите размеры радиоактивной poly(A) методом электрофореза в полиакриламидном геле (табл. 8). Удобными маркерами в данном случае являются мяРНК клеток млекопитающих.

Таблица 21. Анализ poly(A) методом щелочного гидролиза

1. После транскрипции (табл. 5) выделите полиаденилированные РНК-транскрипты методом аффинной хроматографии на poly(U)-сефарозе (табл. 19) и обработайте их РНКазами А и Т1 (табл. 20, пп. 1—4), чтобы отделить радиоактивную poly(A).
2. Высушите пробу под вакуумом и растворите ее в 25 мкл 0,3 М КОН. Внесите раствор в стеклянный капилляр, запаяйте его и инкубируйте при 37 °С 18 ч.
3. Перенесите гидролизованную poly(A) в микроцентрифужную пробирку, разломив капилляр. Доведите pH раствора до нейтрального, добавляя 3 М хлорную кислоту, и затем отцентрифугируйте в микроцентрифуге 10 мин, чтобы осадить выпавший перхлорат калия.
4. Высушите супернатант под вакуумом и затем растворите остаток в 20 мкл воды, содержащей 100 мкг аденозина.
5. Нанесите пробу на полоску бумаги Whatman № 1. Проводите хроматографию 18 ч при комнатной температуре, используя в качестве растворителя смесь 1-бутанол : 0,1 М хлорид аммония (6 : 1, по объему).
6. Отметьте положение маркера аденозина при освещении УФ-светом.
7. Разрежьте хроматограмму на полоски (шириной 1 см) и элюируйте отдельно каждую полоску небольшим объемом 0,3 М NaOH. Нейтрализуйте каждую фракцию, добавляя 3 М уксусную кислоту, и определите радиоактивность фракций на сцинтилляционном счетчике, используя смесь тритон X-100 — толуол — омнифлуор[1]. АМР остается на старте, а аденозин мигрирует на 10—20 см.

[1] 13 г омнифлуора (NEN), 2 л толуола, 1 л тритона X-100.

отличают действительный синтез от обмена концевых звеньев poly(A). Отношение [^{3}H]-АМР к [^{3}H]-аденозину должно быть равно длине poly(A)-последовательности. В случае же обмена концевых звеньев poly(A) или наращивания ранее имевшейся poly(A) отношение [^{3}H]-АМР к [^{3}H]-аденозину будет гораздо ниже, чем длина poly(A).

6.4.2. Метилирование

Активность, ответственную за метилирование РНК в изолированных ядрах, можно восстановить [35] добавлением того же клеточного экстракта, который восстанавливает полиаденилирующую активность (разд. 6.4.1). За метилированием РНК следят по метке, используя в качестве меченого радиоактивного предшественника [^{3}H]CH_3-S-аденозилметионин (табл. 22). Метилированные основания идентифицируют после гидролиза РНК РНКазой Т1, нуклеазой Р1 и щелочной фосфатазой с последующим электрофорезом и хроматографией в тонком слое. Ме-

Таблица 22. Метилирование РНК-транскриптов

1. Проинкубируйте ядра, как описано в табл. 5, используя в качестве радиоактивного предшественника [^{3}H]CH_3-S-аденозилметионин в концентрации 10 мкМ с удельной радиоактивностью минимум 10 Ки/мМ. В каждую пробу добавьте 80 мкл клеточного экстракта, полученного согласно табл. 18. Остальные компоненты возьмите в той же концентрации, что и в стандартной реакционной смеси для транскрипции (табл. 5, п. 1).
2. Выделите РПК-транскрипты способом, описанным в табл. 6. В РНК включается только 20—30% [^{3}H]CH_3-S-аденозилметионина. Остальная радиоактивность включается в ДНК и белок.
3. Обработайте метилированную РПК РПКазами Т1 и Т2 и фракционируйте олигонуклеотиды хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе в 7 М мочевине (табл. 12, пп. 3—6).
4. Соберите элюированные олигонуклеотиды, затем обессольте пробу и обработайте ее нуклеазой Р1 и щелочной фосфатазой (табл. 12, пп. 8—13).
5. Проведите анализ нуклеозидов методом тонкослойной хроматографии, чтобы идентифицировать метилированные основания [36].

тилирование идет на продуктах транскрипции, синтезируемых всеми тремя эукариотическими РНК-полимеразами. Происходит также интенсивное метилирование эндогенных предшественников рРНК, но метилирование предшественников тРНК и мРНК наблюдается преимущественно на молекулах РНК, синтезированных in vitro [35].

6.4.3. Кэпирование молекул — предшественников мРНК

Анализ кэпирования первичных РНК-транскриптов, синтезированных in vitro, описан в разд. 4.3.4. Шаткин и др. [51] установили, что мРНК реовируса начинаются с GTP и растущие цепи в присутствии S-аденозилметионина сразу же кэпируются с образованием метилированной 5′-концевой кэп-структуры m^7GpppG^m. При соответствующих условиях образование кэпа может также происходить после транскрипции, что позволяет предположить, что активности полимеразы и ферментов кэпирования не являются тесно сопряженными. Пытаясь выделить первичные продукты перед процессингом, мы исследовали синтез РПК реовируса с помощью вирусных «коровых» ферментов, используя в качестве субстратов тионуклеотиды. В присутствии [β-^{32}P] [γ-S]-GTP как маркера инициации первичные транскрипты реовирусной мРНК были синтезированы in vivo «коровым» ферментом, находящимся в препарате вируса [23]. Многие транскрипты содержали трифосфорилированные 5′-концы, которые не были кэпированы. Более того, фосфогидролаза, связанная с вирионом, гидролизовала GTP в GDP, но не могла гидролизовать [γ-S]-GTP. Таким образом было показано, что кэпирование является посттранскрипционным процессом. Поскольку γ-тиофосфатная группа кислотонеустойчива, ее можно

удалить слабой кислотой, например 7%-ной муравьиной [23], без разрыва фосфодиэфирной связи в РНК. Это позволяет изучать реакцию кэпирования, используя РНК, инициированную in vitro.

6.4.4. Сплайсинг молекул предшественников мРНК

Анализ сплайсинга (образования зрелых молекул мРНК) первичных транскриптов, синтезируемых РНК-полимеразой II, in vitro в изолированных ядрах клеток млекопитающих не дал удовлетворительных результатов. Есть сообщения [52, 53], что аденовирусная РНК подвергается сплайсингу в препарате неочищенных ядер клеток HeLa, но насколько эффективно идет этот процесс, не установлено. Тем не менее не исключено, что ядра клеток млекопитающих могут оказаться полезными в приготовлении субстратов для сплайсинга и обнаружении продуктов сплайсинга с помощью гибридизации, как описано выше. Преимущество системы, содержащей целые ядра, заключается в том, что РНК в ней находится в нативной конформации в комплексе с соответствующими белками.

6.4.5. Процессинг предшественников тРНК

Изолированные ядра способны к синтезу молекул-предшественников тРНК, но не способны поддерживать их процессинг с образованием зрелой тРНК [2]. Отсутствующая активность ферментов, обеспечивающих процессинг, не восстанавливается при добавлении клеточных экстрактов, приготовленных в 0,35 М KCl (табл. 18) и способных восстановить полиаденилирование (разд. 6.4.1) и метилирование (разд. 6.4.2). Однако эту активность можно восстановить добавлением экстрактов, приготовленных из неочищенных ядер в 0,15 М KCl [2]. За процессингом предшественников тРНК с превращением в зрелую тРНК удобнее всего следить с помощью электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле (табл. 8).

6.4.6. Процессинг предшественников рРНК

К моменту написания книги не было никаких данных об успешном процессинге предшественников эукариотической рРНК в бесклеточной системе.

6.5. Изучение ядерного транспорта зрелой РНК

Для исследования РНК, вышедшей из ядер, реакционную смесь для транскрипции (табл. 5) разбавляют одним объемом раствора: 0,1 М KCl, 5 мМ ацетат магния, 10 мМ трис-HCl,

pH 7,5, наслаивают поверх равного объема буфера для хранения с глицеролом (табл. 1) и центрифугируют при 1000 g 2 мин. Супернатант содержит вышедшую РНК, а осадок — РНК, оставшуюся внутри ядер. Когда транскрипцию проводят в отсутствие клеточных экстрактов, выхода РНК не происходит, за исключением малых РНК (5S-РНК, предшественников тРНК, мяРНК) [6]. Добавление экстракта (табл. 18), приготовленного из клеток миеломы, приводит к дополнительному выходу молекул РНК большего размера, в том числе poly(A^+)-РНК [50]. Вышедшие РНК можно проанализировать на присутствие специфических транскриптов методом гибридизации, описанным выше.

6.6. Изучение регуляторных факторов

Важное применение изолированных ядер заключается в обнаружении с их помощью факторов, участвующих в регуляции транскрипции и изучении взаимодействия этих факторов с хроматином. Мы использовали ядра, выделенные из зародышей морского ежа, для выявления и частичной очистки ингибитора РНК-полимеразы III, присутствующего в ядрах морского ежа [6]. Было показано [54], что экстракты ядер в 0,35 М KCl значительно снижают транскрипцию всеми тремя РНК-полимеразами, а восстановление транскрипции достигается при добавлении белков 1 и 2 из группы белков с высокой электрофоретической подвижностью (HMG-белков; от англ. High Mobility Group). Таким образом, существует возможность обратимо изменять транскрипцию в изолированных ядрах. В будущем этот подход позволит значительно углубить представления о механизме регуляции транскрипции.

Благодарности

Методы, описанные в этой главе, были разработаны в наших лабораториях в течение последних десяти лет. Мы особо отмечаем вклад докторов А. Рива, М. Смита, Дж. Фрагосо, Дж. Мошиера, Д. Купера, А. Браун, Дж. Моррис и Д. Ситмана в разработку многих методов в области исследований, описанных в данной главе. Эта работа была субсидирована NIH.

Литература

1. *Marzluff W. F., Murphy E. C., Huang R. C. C.* Biochemistry (Wash.), **12**, 340 (1973).
2. *Marzluff W. F., Murphy E. C., Huang R. C. C.* Biochemistry (Wash.), **13**, 3689 (1974).
3. *Tilghman S. M., Belayew A.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 5254 (1982).

4. *Ernest M. M., Schultz G., Feigelsen P.* Biochemistry (Wash.), **15**, 824 (1976).
5. *Price R., Penman S.* J. Mol. Biol., **70**, 435 (1972).
6. *Morris G. M., Marzluff W. F.* Biochemistry (Wash.), **22**, 645 (1983).
7. *Panyim S., Chalkley R.* Arch. Biochem. Biophys., **130**, 337 (1969).
8. *Zweidler A.* Methods Cell Biol., **17**, 223 (1978).
9. *Thomas J. O., Kornberg R. D.* Methods Cell Biol., **18**, 429 (1978).
10. *Harvey W., Atkinson B. G.* Can. J. Biochem., **60**, 21 (1982).
11. *Gurney T., Foster D. N.* Methods Cell Biol., **16**, 45 (1977).
12. *Marzluff W. F., Huang R. C. C.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 1082 (1975).
13. *Roeder R. G.* In: RNA Polymerase, Losick R. and Chamberlain M. (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. 285, 1976.
14. *Wagner F. K., Katz L., Penman S.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **28**, 152 (1967).
15. *Chirgwin J. M., Przbyla A. E., MacDonald R. J., Rutter W. J.* Biochemistry (Wash.), **18**, 5294 (1979).
16. *Benecke B.—J., Ben—Ze'ev A., Penman S.* Cell, **14**, 931 (1978).
17. *McMaster G. K., Carmichael G. G.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 4935 (1977).
18. *Marzluff W. F., Pan C. J., Cooper D. L.* Nucleic Acids Res., **5**, 4177 (1978).
19. *Goody R. S., Eckstein F. J.* Am. Chem. Soc., **93**, 6252 (1971).
20. *Goody R. S., Eckstein F., Sehinanu R. H.* Biochim. Biophys. Acta, **276**, 155 (1972).
21. *Reeve A. E., Smith M. M., Pigiet V., Huang R. C. C.* Biochemistry (Wash.), **16**, 4464 (1977).
22. *Smith M. M., Reeve A. E., Huang R. C. C.* Cell, **15**, 615 (1978).
23. *Reeve A. E., Shatkin A. J., Huang R. C. C.* J. Biol. Chem., **257**, 7018 (1982).
24. *Benz E. W., Wydro R. M., Nadel—Ginard N., Dina D.* Nature, **288**, 655 (1980).
25. *Cuatrecasas P.* J. Biol. Chem., **245**, 3059 (1970).
26. *Smith M. M., Huang R. C. C.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 775 (1976).
27. *Huang R. C. C.* In: Genetic Engineering Techniques, Huang R. C. C., Kuo T. T. and Wu R. (eds.), Academic Press, p. 93, 1983.
28. *Ide G.* Biochemistry (Wash.), **20**, 2633 (1981).
29. *Hipskind R. A., Reeder R. H.* J. Biol. Chem., **255**, 7896 (1980).
30. *Sun J. Y., Johnson E. M., Allfrey V. G.* Biochemistry (Wash.), **18**, 4572 (1979).
31. *Washington L. D., Stallcup M. R.* Nucleic Acids Res., **10**, 8311 (1982).
32. *Connolly B. A., Rowaniuk P. J., Eckstein F.* Biochemistry (Wash.), **21**, 1983 (1982).
33. *Eckstein F., Goody R. S.* Biochemistry (Wash.), **15**, 1685 (1976).
34. *Stallcup M. R., Washington L. D.* J. Biol. Chem., **258**, 2802 (1983).
35. *Brown A., Marzluff W. F.* Biochemistry (Wash.), **21**, 4303 (1982).
36. *Contreras R., Fiers W.* Nucleic Acids Res., **9**, 215 (1981).
37. *Dale R. M. K., Livingston D. C., Ward D. C.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**, 2238 (1973).
38. *Crouse G. F, Fodor E. J. B., Doty P.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 1564 (1976).
39. *O'Malley B. W., Tsai M. J., Tsai S. Y., Towle H. C.* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **42**, 605 (1978).
40. *Carrol A. R., Wagner R.* J. Biol. Chem., **254**, 9339 (1979).
41. *Reeve A. E., Johnson L. P.* J. Chromatogr., **177**, 127 (1979).
42. *Schibler U., Marcu K. B., Perry R. P.* Cell, **15**, 1495 (1978).
43. *Rave N., Crkvenjakov R., Boedtker H.* Nucleic Acids Res., **11**, 3559 (1979).
44. *Bailey J. M., Davidson N.* Anal. Biochem., **70**, 75 (1976).
45. *Sittman D. B., Graves R. A., Marzluff W. F.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 1849 (1983).

46. *Weintraub H., Larsen II., Groudine M.* Cell, **24**, 333 (1981).
47. *Hofer E., Hofer—Warbinek R., Darnell J.* Cell, **29**, 887 (1982).
48. *D'Alessio J. M.* In: Gel Electrophoresis of Nucleic Acids — A Practical Approach, Rickwood D. and Hames B. D. (eds.), IRL Press Ltd., Oxford and Washington, DC, p. 173, 1982.
49. *Smith M. M., Reeve A. E., Huang R. C. C.* Biochemistry (Wash.), **17**, 493 (1978).
50. *Cooper D. L., Marzluff W. F.* J. Biol. Chem., **253**, 8375 (1978).
51. *Furuichi Y., Morgan M., Muthukrishnan S., Shatkin A.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 362 (1975).
52. *Blanchard J. M., Weber J., Jelinek W., Darnell J. E.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 5341 (1978).
53. *Yang Y. W., Lerner M. R., Steitz J. A., Flint S. J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 1371 (1981).
54. *Stoute J., Marzluff W. F.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **107**, 1279 (1982).

ТРАНСКРИПЦИЯ ХРОМАТИНА

С. Гилмор

1. Введение

Изолированный эукариотический хроматин может служить матрицей для транскрипции in vitro, если в инкубационную смесь добавить РНК-полимеразы. Таким образом, в распоряжении исследователей имеется еще одна бесклеточная система для изучения механизмов регуляции генной экспрессии. Более того, поскольку хроматин можно реконструировать из его основных структурных компонентов, такая система позволяет проверять вклад в ее работу каждого из этих компонентов, а также механизм их взаимодействия. Подробный обзор работ, лежащих в основе этого метода, опубликован ранее [1].

С появлением кДНК-зондов для индивидуальных генов стал возможным анализ хроматиновых транскриптов на присутствие в них специфических последовательностей мРНК, содержащихся в очень малых количествах. Применяя такие зонды, несколько групп исследователей получили данные о синтезе тканеспецифической мРНК на изолированном хроматине при добавлении экзогенной РНК-полимеразы [2—6]. Однако интерпретация данных, полученных в этих и дальнейших работах, встретила ряд возражений, касающихся также вообще всех систем транскрипции in vitro. В этой главе сделан обзор методик, связанных с транскрипцией изолированного хроматина. Особое внимание в ней уделяется возможным артефактам, которые следует учитывать при планировании экспериментов.

2. Выделение хроматина

В настоящее время нет единой, оптимальной для всех типов тканей методики выделения хроматина; с этой целью применяют разнообразные приемы. При выборе такого приема следует принимать во внимание следующие моменты:

1. Желательно, чтобы изолированные ядра исходно содержали как можно меньше цитоплазматического материала. Эффективный способ избавления от него состоит в снятии внешней ядерной мембраны неионным детергентом, например тритоном X-100.
2. Растворимые компоненты нуклеоплазмы необходимо удалить путем лизиса и экстракции ядер в буферах с низкой ионной

Таблица 1. Выделение хроматина[1]

1. Вручную гомогенизируйте 1 г (сырой вес) ткани в гомогенизаторе Даунса (с зазором 0,025 мм) в 36 мл 5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ДТТ, 3 мМ $CaCl_2$, 0,1%-ного тритона X-100, 2 мМ трис-HCl, pH 7,5, в течение 2 мин. Оставьте гомогенат во льду на 5 мин.
2. Добавьте 4 мл 2 М сахарозы и гомогенизируйте еще 30 с.
3. Наслоите 20 мл гомогената на 15 мл 2 М сахарозы, 1 мМ ДТТ, 5 мМ $MgCl_2$, 0,28 М NaCl, 2 мМ трис-HCl, pH 7,5, и затем отцентрифугируйте в бакет-роторе при 30 000*g* 1 ч при 4 °С. При этом ядра осаждаются.
4. Ресуспендируйте осадок в 20 мл 2 мМ ЭДТА, 1%-ного тритона X-100, 0,28 М NaCl, 1 мМ трис-HCl, pH 7,9, и отцентрифугируйте суспензию в бакет-роторе при 12 000*g* 10 мин при 4 °С.
5. Промойте осадок три раза в 2 мМ ЭДТА, 1 мМ трис-HCl, pH 7,9, ресуспендируя и центрифугируя его, как в п. 4. Промытый осадок (вязкий гель) представляет собой хроматин.

[1] Если исследуемая ткань богата эндогенными протеазами, то можно добавить бисульфит натрия (50 мМ) или диизопропилфторфосфат (1 мМ), или PMSF (1 мМ).

силой. Однако при этих условиях не должны удаляться белки, связанные с самим хроматином.

3. Не рекомендуется подвергать хроматин механической деградации и обработке ультразвуком. Такие воздействия делают хроматин более удобным в работе, но при этом могут появляться свободные концы ДНК, а хроматин может разворачиваться из-за удаления белков, в результате чего не исключено изменение транскрипционных свойств хроматина.
4. Некоторые ткани богаты протеазами и нуклеазами. Поэтому необходимо принять меры для снижения деградации хроматина: выполнять все этапы выделения при 4 °С и, где возможно, использовать ингибиторы. В опубликованных обзорах [7, 8] дается сравнительная оценка различных препаративных методов, применяемых на самых разных клетках. Метод, описанный в табл. 1 (где учитываются высказанные выше соображения), применим для большинства тканей, с которыми работали в нашей лаборатории.

3. Источник РНК-полимеразы

Эукариотические мРНК синтезируются in vivo РНК-полимеразой II. Недавно описан метод получения фермента из клеток HeLa [9], который способен инициировать синтез РНК с аутентичного кэп-сайта различных выделенных клонированных ДНК-матриц. К сожалению, использование этого фермента в экспериментах на изолированном хроматине или на ядерных матрицах осложнено тем, что невозможно различить истинную de novo инициацию цепей РНК и реактивацию комплексов, ранее неактивных. Это препятствует однозначному пониманию тран-

Таблица 2. Реактивы, необходимые для выделения РНК-полимеразы *E. coli*

Буфер 1 (10-кратный)
0,1 М $MgCl_2$
1 мМ ЭДТА
0,1 М трис-HCl, pH 7,9

Буфер 2
10 мМ $MgCl_2$
0,01 мМ ЭДТА
0,2 М KCl
0,1 мМ ДТТ
5%-ный глицерол
50 мМ трис-HCl, pH 7,5

Буфер 3
10 мМ $MgCl_2$
0,1 мМ ЭДТА
1 мМ ДТТ
5%-ный глицерол
25,6 г сульфата аммония (enzyme grade) на 100 мл
10 мМ трис-HCl, pH 7,9

Буфер 4
1 мМ ЭДТА
0,2 мМ ДТТ
10%-ный глицерол
20 мМ трис-HCl, pH 7,9

Буфер для хранения
10 мМ $MgCl_2$
0,1 мМ ЭДТА
0,1 мМ ДТТ
0,1 М KCl
60%-ный глицерол
10 мМ трис-HCl, pH 7,9

DE-52-целлюлоза

Промойте 200 г целлюлозы Whatman DE-52 (предварительно набухшей) в 0,5 л 2 М NaCl в течение 30 мин. Слейте супернатант и промойте целлюлозу дистиллированной водой. Внесите целлюлозу в колонку (5×15 см) и уравновесьте ее сначала 10-кратным буфером 1, а затем однократным буфером 1.

Биогель А 1,5

Внесите биогель А 1.5 в колонку (3×75 см) и уравновесьте его буфером 1, содержащим 1 М KCl.

ДНК-целлюлоза

1. Промойте 50 г целлюлозы Whatman CF-11 абсолютным этанолом (500 мл), дистиллированной водой (500 мл), 1 М NaOH (500 мл), дистиллированной водой (500 мл) и, наконец, 1 М HCl (500 мл). Промойте еще раз дистиллированной водой до нейтрального pH и высушите целлюлозу на воздухе.
2. Растворите 0,8 г ДНК тимуса теленка (Worthington) в 400 мл 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl, pH 7,5, хорошо перемешайте с сухой целлюлозой CF-11 и затем просушите смесь в токе теплого воздуха или оставьте при 60 °С на ночь.
3. Стеклянной палочкой размельчите комки ДНК-целлюлозы и ресуспендируйте порошок в 400 мл абсолютного этанола.
4. В течение 3 ч встряхивайте ДНК-целлюлозу, одновременно облучая смесь УФ-светом (Gallenkamp, LH530) с расстояния 10 см.

5. Отфильтруйте ДНК-целлюлозу и промойте ее 3 раза раствором 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl, pH 7,5 (по 2 л каждый раз).
6. Внесите суспензию ДНК-целлюлозы[1] в колонку (2×10 см) и уравновесьте ее буфером 4.

[1] Чтобы оценить количество связавшейся ДНК, прогрейте суспензию ДНК-целлюлозы при 100 °С 10 мин. Осадите целлюлозу центрифугированием и измерьте A_{260} супернатанта (1 ед. поглощения при 260 нм соответствует 50 мкг/мл ДНК).

Таблица 3. Выделение РНК-полимеразы *E. coli*

Определение активности РНК-полимеразы E. coli

Описанный ниже метод удобен для проверки степени чистоты РНК-полимеразы *E. coli*.

1. Смешайте:
   25,0 мкл 50 мМ $MgCl_2$, 0,75 М KCl, 0,2 М трис-HCl, pH 7,9
   3,0 мкл 0,1 М натрийфосфатного буфера, pH 7,5
   12,5 мкл 1 мМ ДТТ
   12,5 мкл 1 мМ ЭДТА
   по 5,0 мкл 4 мМ растворов каждого из трифосфатов ATP, CTP, GTP и [^{3}H]-UTP (2,5 мкКи/ммоль)
   30 мкл ДНК тимуса теленка (0,7 мг/мл)
   12,5 мкл БСА (0,6 мг/мл)
   27,5 мкл пробы (если нужно, добавьте воды)
2. Проинкубируйте при 37 °С 10 мин. 100 мкл инкубационной смеси нанесите пипеткой на полоску фильтровальной бумаги Whatman № 3 (1,0×2,0 см) и опустите полоску в охлажденную льдом 10%-ную ТХУ.
3. Промойте ее два раза в 10%-ной ТХУ и один раз в абсолютном этаноле.
4. Высушите полоску, поместите ее в сцинтиллятор и определите радиоактивность на сцинтилляционном счетчике.

Очистка

1. Разрушьте 200 г клеток *E. coli* (штамм MRE 600) в 200 мл буфера 2 с 500 г стеклянных шариков[1] на встряхивателе Vibromix, включая прибор 5 раз на 2 мин. Во время лизиса поддерживайте температуру ниже 15 °С.
2. Добавьте к лизату 1,5 мл ДНКазы (1 мг/мл) и оставьте его во льду на 30 мин.
3. Слейте жидкость и держите ее во льду. Промойте стеклянные шарики два раза буфером 2 и объедините буфер после промывки с первоначальным супернатантом. Объем буфера для промывки подберите так, чтобы общий объем был 350 мл.
4. Отцентрифугируйте объединенный лизат при 150 000*g* 3 ч (например, в угловом роторе MSE 65 при 45 000 об/мин).
5. Отберите супернатант и медленно добавьте 23,1 г сухого сульфата аммония на 100 мл, перемешивая раствор во льду. Продолжайте перемешивать во льду еще 30 мин.
6. Отцентрифугируйте смесь при 10 000*g* 10 мин.
7. Отберите супернатант и отбросьте осадок. На 100 мл супернатанта, находящегося во льду, добавьте 10,75 г сульфата аммония с перемешиванием.
8. Отцентрифугируйте смесь при 10 000*g* 10 мин.
9. Слейте супернатант и соберите осадок. Ресуспендируйте его в 300 мл буфера 3, гомогенизируя вручную.
10. Отцентрифугируйте смесь при 10 000*g* 10 мин.
11. Слейте супернатант. Растворите осадок в таком количестве буфера 1, чтобы проводимость раствора стала ниже проводимости буфера 1, содержащего 0,13 М KCl.

12. Нанесите пробу (300—400 мл) на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (ДЕ-52, 5×15 см), уравновешенной буфером 1 (табл. 2). Пробу наносите самотеком в течение ~3 ч.
13. Промывайте колонку буфером 1, содержащим 0,13 М KCl, до тех пор, пока A_{280} элюата не станет меньше 0,1.
14. Элюируйте линейным градиентом соли, используя 300 мл буфера 1, содержащего 0,13 М KCl, и 300 мл буфера 1, содержащего 0,4 М KCl. Соберите фракции по 10 мл.
15. Проверьте каждую вторую фракцию на РНК-полимеразу, используя описанную выше методику. При элюции солевым градиентом этот фермент обычно элюируется в первых нескольких фракциях.
16. Соберите фракции, содержащие РНК-полимеразную активность, и осадите фермент добавлением 35 г сухого сульфата аммония на 100 мл раствора. Перемешивайте во льду 30 мин.
17. Отцентрифугируйте смесь при 10 000g 10 мин. Слейте супернатант и растворите осадок фермента в 5 мл буфера 1, содержащего 1 М KCl.
18. Нанесите раствор на колонку (3×75 см) с биогелем А 1.5, уравновешенную буфером 1, содержащим 1 М KCl (табл. 2). Проведите элюцию с колонки этим буфером при скорости протока 0,5 мл/мин и соберите фракции по 10 мл. Проверьте РНК-полимеразную активность каждой второй фракции, этот фермент обычно элюируется в первых нескольких фракциях, содержащих белок.
19. Объедините фракции, содержащие РНК-полимеразу, и осадите фермент добавлением 1,5 объема насыщенного сульфата аммония, растворенного в буфере 4. Перемешивайте во льду 30 мин.
20. Отцентрифугируйте смесь при 10 000g 10 мин. Слейте супернатант и растворите осадок фермента в буфере 4. Проведите диализ против этого буфера в течение ночи при 4 °С.
21. Нанесите раствор фермента на колонку (2×10 см) с ДНК-целлюлозой (табл. 2, 3,5 мг ДНК/мл целлюлозы в колонке), уравновешенной буфером 4. Элюируйте колонку буфером 4 до тех пор, пока A_{280} элюата не станет меньше 0,05.
22. Элюируйте РНК-полимеразу буфером 4 с 0,65 М KCl. Осадите фермент добавлением 1,5 объема насыщенного сульфата аммония — так же, как в п. 19.
23. Отцентрифугируйте смесь при 10 000g 10 мин. Растворите осадок в 2 мл буфера для хранения (табл. 2) и храните при —20 °С.

[1] Стеклянные шарики (диаметром ~0,1 мм) предварительно промойте концентрированной HCl 15 мин, а затем дистиллированной водой до нейтрального pH.

скрипции какого-либо активного гена экзогенной РНК-полимеразой II. Более того, эффективность транскрипции препаратами РНК-полимеразы II даже клонированных ДНК-матриц очень низка (копируется только одна молекула ДНК из тысячи), так что обнаружение специфических транскриптов на хроматиновых матрицах — задача нелегкая. По этим причинам первые эксперименты проводили с бактериальными РНК-полимеразами, которые легче выделяются и гораздо более активны в транскрипции. В этой главе описано использование бактериальной РНК-полимеразы для транскрипции хроматина in vitro и обсуждается правомерность использования прокариотического фермента на эукариотической матрице (разд. 6). Транскрипция хрома-

тина эндогенной РНК-полимеразой обсуждается в гл. 4, разд. 2.5.

Бо́льшая часть работ по транскрипции in vitro изолированного хроматина была выполнена с использованием РНК-полимеразы *Escherichia coli*. Очистка этого фермента подробно описана в литературе. Для нее, как правило, применяют метод Барджеса [10], в котором классическое разделение с сульфатом аммония объединено с последующей ионообменной хроматографией и гель-фильтрацией. Более быстрая очистка включает фракционирование с помощью осаждения полиэтиленимином [11] или связывание на колонках либо с ДНК-целлюлозой [12], либо с гепарин-сефарозой [13]. В табл. 2 и 3 описан метод, который мы предпочитаем другим. Все эти методы приводят к получению конечного продукта с удельной активностью ~800 ед./мг белка (1 ед. фермента осуществляет включение 1 нмоля UTP в РНК за 10 мин при 37 °С). В продаже имеется РНК-полимераза *E. coli* фирм Sigma Chemical Co. и Miles Research Products.

4. Оптимальные условия транскрипции in vitro

4.1. Проблемы, связанные с эндогенной РНК

В первых экспериментах по исследованию РНК, синтезированных на матрицах хроматина, ограничивались лишь характеристикой популяций РНК по их гибридизационной специфичности. В дальнейшем, когда появились кДНК-зонды, и еще позже, с развитием S1-нуклеазного картирования, стало возможным выявление специфических мРНК, присутствующих в очень малых количествах. К сожалению, количество эндогенной РНК, инициированной in vivo и связанной с изолированным хроматином, в целом сравнимо с количеством РНК, которое должно синтезироваться in vitro при добавлении РНК-полимеразы. Количество эндогенной РНК в пробе РНК, синтезированной in vitro, можно определить по гибридизации со специфической ДНК-зондом. Чтобы получить количество специфической РНК, транскрибированной экзогенной РНК-полимеразой, количество эндогенной РНК вычитают из общего количества РНК, имеющегося после транскрипции in vitro. Однако в большинстве случаев этот способ неудовлетворителен, поскольку реакции гибридизации зависят от РНК, и таким образом, малейшие различия в количестве примесных эндогенных РНК в сравниваемых пробах могут приводить к результатам, вводящим в заблуждение. По этой причине ранее полученные данные относительно селективной генной экспрессии на изолированном хроматине [2—6] следует считать спорными.

Альтернативным способом решения этой проблемы является разделение эндогенной и новообразованной РНК после транскрипции in vitro. Это можно сделать с помощью меркурированного UTP (Hg-UTP), который включается в РНК бактериальной РНК-полимеразой на матрице хроматина. Транскрипты, образующиеся in vitro, отделяют от эндогенной РНК методом аффинной хроматографии на тиолированной сефарозе; при этом эндогенная РНК, не содержащая замещенных оснований, не связывается с сорбентом, в то время как большая часть меркурированного РНК-транскрипта хорошо связывается с ним. Связавшийся РНК-транскрипт элюируют с колонки буфером, содержащим тиольное соединение. Очищенный РНК-транскрипт анализируют затем методом гибридизации с кДНК-зондом, специфичным к изучаемому гену. Этот подход был использован несколькими группами исследователей для анализа образованных in vitro транскриптов в системе с хроматином, выделенным из клеток разного типа [14—18]. В последние годы в его адрес был высказан ряд серьезных замечаний [19—21]. В частности, было показано, что при определенных экспериментальных условиях РНК-полимераза *E. coli* наряду с ДНК транскрибирует эндогенную РНК. При этом образуются молекулы двухцепочечной гибридной РНК, состоящие из цепи эндогенной РНК и цепи меркурированной антисэнс-РНК; эти молекулы задерживаются на тиолированной сефарозе. К счастью, в отличие от транскрипции ДНК копирование РНК РНК-полимеразой *E. coli* не чувствительно к актиномицину D. Поэтому уровень транскрипции, зависящей от РНК, можно определить с помощью простого теста с актиномицином D. Если перед аффинной хроматографией нагреть пробы для денатурации двухцепочечной РНК, то удается отделить эндогенную РНК как от меркурированной, антисэнс-цепи РНК, так и от аутентичных транскриптов, скопированных с ДНК. При использовании в последующем анализе кДНК-зонда, комплементарной только к смысловой цепи РНК, антисэнс-цепь не будет мешать, поскольку она имеет ту же последовательность, что и сама кДНК-зонд. Поэтому гибридизация будет происходить только между кДНК и РНК, транскрибированной на ДНК-матрице.

Несмотря на то что, пользуясь описанным выше методом, можно отличать аутентичную транскрипцию от ложной, очевидно, имеет смысл оптимизировать условия транскрипции изолированного хроматина in vitro таким образом, чтобы происходила только ДНК-зависимая транскрипция. Изучая эту проблему, мы проверили транскрипцию РНК-полимеразой *E. coli* β-глобиновых генов в системе с хроматином печени плода мыши. В результате этой работы были определены условия, при

которых идет только ДНК-зависимая транскрипция [22, 23]. Ключевую роль в этой системе играют дивалентные катионы. В присутствии ионов Mg^{2+} транскрипция β-глобиновых генов является ДНК-зависимой и асимметричной. Это следует из того, что: 1) высокие концентрации актиномицина D (250 мкг/мл) ингибируют транскрипцию на 95%, 2) меркурированные транскрипты гибридизуются с глобиновой кДНК и эти гибриды задерживаются на тиолированной сефарозе и 3) при гибридизации с глобиновой антисэнс-кДНК (т. е. ДНК, комплементарной глобиновой кДНК и имеющей такой же «смысл», как глобиновая мРНК) не обнаружено сколько-нибудь значительных количеств β-глобиновой антисэнс-РНК. Напротив, при замене Mg^{2+} на Mn^{2+} имеет место заметная РНК-зависимая транскрипция. При этим условиях синтез РНК только на 40—50% чувствителен к антиномицину D, и гибридизация с глобиновой антисэнс-кДНК подтверждает, что копируется эндогенная глобиновая мРНК. Кроме того, есть данные, что молекулы новообразованной двухцепочечной гибридной РНК могут служить матрицами для дальнейшего синтеза (меркурированных) глобиновых РНК-транскриптов, имеющих такую же полярность, как исходная мРНК [23]. При тепловой денатурации перед хроматографией на тиолированной сефарозе этот фон не устраняется.

4.2. ДНК-зависимая транскрипция хроматина

В этом разделе подробно описаны методы транскрипции хроматина in vitro РНК-полимеразой *E. coli* и выделение РНК-транскриптов с помощью аффинной хроматографии на тиоли-

Таблица 4. Выделение меркурированного UTP[1]

1. Растворите 24 мг UTP в 2 мл 0,1 М ацетата натрия, pH 6,0, и проинкубируйте раствор при 50 °С 1 ч с равным объемом 0,1 М ацетата двухвалентной ртути, растворенного в том же буфере.
2. Добавьте 1 мл (в расчете на плотно осевшую смолу) хелатирующей смолы Dowex (50—100 меш., Sigma), предварительно промытой дистиллированной водой, pH которой доведен до 7,0 0,1 М NaOH. Перемешайте и оставьте суспензию во льду на 5 мин.
3. Поместите суспензию в пластиковый шприц одноразового использования объемом 5 мл с концом, забитым стекловатой, и отцентрифугируйте (500*g*, 10 мин) раствор в чистую пробирку.
4. Повторите операции, описанные в пп. 2 и 3.
5. Осадите Hg-UTP двумя объемами абсолютного этанола. Отцентрифугируйте осадок.
6. Повторите операцию, описанную в п. 5.
7. Высушите Hg-UTP под вакуумом и растворите в 2 мл дистиллированной воды. Концентрация Hg-UTP должна быть 20 мМ.

[1] По [19], с некоторыми изменениями.

Таблица 5. Транскрипция хроматина in vitro

1. Приготовьте реакционную смесь (в 2 мл конечного объема) следующего состава:
   0,8 мМ раствор каждого из трифосфатов ATP, GTP, CTP
   0,5 мМ UTP
   0,3 мМ Hg-UTP (табл. 4)
   1 мг ДНК хроматина
   200—400 ед. РНК-полимеразы *E. coli* (табл. 3)
   14 мМ 2-меркаптоэтанол
   5 мМ $MgCl_2$
   0,15 М KCl
   40 мМ трис-HCl, pH 7,9
2. Проинкубируйте смесь при 37 °С 1 ч и затем остановите реакцию добавлением 100 мкл 10%-ного саркозила и 50 мкл 0,1 М ЭДТА.
3. Обработайте раствор ультразвуком, чтобы уменьшить вязкость (2—3 периода по 10 с), затем добавьте протеиназу К (Merck) до конечной концентрации 50 мкг/мл и проинкубируйте при 37 °С 15 мин.
4. Депротеинизируйте раствор, перемешивая его встряхиванием с равным объемом смеси фенол : хлороформ[1] (1 : 1, по объему) и разделите фазы центрифугированием (1000*g*, 5 мин). Отберите верхний (водный) слой и добавьте к нему три объема абсолютного этанола. Перемешайте и оставьте раствор при —20 °С на 1 ч, чтобы нуклеиновые кислоты выпали в осадок.
5. Отцентрифугируйте осадок (5000*g*, 10 мин) и удалите оставшийся этанол под вакуумом.
6. Растворите осадок нуклеиновых кислот в 0,5 мл 10 мМ трис-HCl, pH 7,9, 50 мМ NaCl и нанесите на колонку (60×1 см) с сефадексом G50, уравновешенную тем же буфером. Соберите фракции, соответствующие свободному объему, и осадите нуклеиновые кислоты этанолом согласно пп. 4 и 5.
7. Растворите нуклеиновые кислоты в 0,5 мл 10 мМ трис-HCl, pH 7,9. Храните их при —20 °С или сразу проведите хроматографию на тиолированной сефарозе, как описано в табл. 6.

[1] Гидроксихинолин в фенол добавлять не следует, поскольку это ускоряет удаление ртути, связанной ковалентно с РНК.

рованной сефарозе с учетом особенностей, рассмотренных в разд. 4.1.

Получение Hg-UTP описано в табл. 4. Таким же способом можно меркурировать CTP и использовать его для транскрипции in vitro вместо Hg-UTP. Оба этих вещества продаются фирмами Sigma и Boehringer. Условия инкубации в случае ДНК-зависимой транскрипции хроматина РНК-полимеразой *E. coli* и последующей экстракции РНК описаны в табл. 5. Меркурированные рибонуклеозидтрифосфаты прочно связываются с РНК-полимеразой и таким образом могут ингибировать активность фермента. Однако добавляемый в реакционную смесь 10—20 мМ 2-меркаптоэтанол конкурентно связывается ртутью в трифосфатах, и это способствует нормальному синтезу РНК. После экстракции меркурированные РНК-транскрипты очищают с помощью аффинной хроматографии на тиолированной сефарозе, как описано в табл. 6, и затем их можно коли-

Таблица 6. Очистка меркурированных РНК-транскриптов на тиолированной сефарозе

1. Промойте колонку (объемом 1 мл) с тиолированной сефарозой 5 мл буфера, имеющего состав: 10 мМ трис-HCl, pH 7,9, 0,2 М NaCl, 1% ДСН, 0,3 М 2-меркаптоэтанол.
2. Промойте колонку 15 мл этого буфера без 2-меркаптоэтанола.
3. Прокипятите раствор нуклеиновой кислоты (табл. 5, п. 7) 4 мин и затем быстро охладите во льду.
4. Добавьте к нему равный объем охлажденного во льду указанного выше буфера двукратной концентрации без 2-меркаптоэтанола, перемешайте и нанесите смесь на предварительно уравновешенную колонку с тиолированной сефарозой. Оставьте ее на колонке на 10 мин без элюции, чтобы дать возможность меркурированной РНК связаться с носителем. Элюируйте не связавшуюся РНК с колонки указанным выше буфером без 2-меркаптоэтанола.
5. Элюируйте меркурированную РНК с колонки 2 мл того же буфера с 0,3 М 2-меркаптоэтанолом.
6. Осадите меркурированную РНК этанолом и отцентрифугируйте ее (табл. 5, пп. 4 и 5).
7. Повторите операцию, описанную в п. 6.
8. Промойте осадок меркурированной РНК 5 мл 75%-ного этанола (охлажденного до 4 °С) и отцентрифугируйте осадок (табл. 5, п. 5).
9. Лиофилизуйте меркурированную РНК, растворите ее в дистиллированной воде и храните при —20 °С.

чественно анализировать методом гибридизации с кДНК (разд. 5.1) или картировать с помощью нуклеазы S1 (разд. 5.2).

5. Анализ РНК-транскриптов

5.1. Гибридизация со специфическими ДНК-зондами

Точное определение количества специфического транскрипта проводят методом гибридизации РНК со специфической [^{3}H]-кДНК-зондом или геномной [^{3}H]-ДНК. После этого добавляют нуклеазу S1 для расщепления негибридизованной ДНК. Меркурированные нуклеиновые кислоты не гибридизируются с комплементарными зондами, особенно при высокой степени замещения на Hg-UTP [17, 20]. Однако при взаимодействии с тиольными реагентами [24] происходит демеркурирование РНК, и поэтому транскрипты, выделенные методом связывания на тиолированной сефарозе с последующей элюцией тиольным соединением (табл. 6), демеркурированы в достаточной степени [23], чтобы гибридизоваться.

Методы выделения очищенной мРНК и обратной транскрипции для получения меченой кДНК подробно описаны [25]. Поскольку количество специфического РНК-транскрипта оценивается прямо по радиоактивности гибридизованной ДНК, ус-

Таблица 7. Гибридизация РНК-транскриптов с ДНК-зондами

1. Добавьте определенное количество меченой ДНК (0,5—1,0 нг), растворенной в дистиллированной воде, к пробам, содержащим небольшие количества РНК-транскрипта (0,1—2,0 мкг), и лиофилизуйте растворы.
2. Растворите каждую пробу в 5 мкл 0,5 М NaCl, 1 мМ ЭДТА, 50%-ного деионизованного формамида[1], 25 мМ HEPES, pH 6,7. Запаяйте каждую пробу в силиконированном стеклянном капилляре, прогрейте при 100 °С 5 мин и затем инкубируйте при 43 °С 2 дня.
3. Перенесите каждую пробу в 0,25 мл раствора, имеющего состав: 2,8 мМ $ZnSO_4$, 0,14 М NaCl, 15 мкг/мл денатурированной ДНК тимуса теленка, 70 мМ натрийацетатный буфер, pH 4,5.
4. Добавьте 100 мкл нуклеазы S1 (1000 ед.), проинкубируйте при 37 °С 2 ч и затем поместите в лед на 5 мин.
5. Отберите по 100 мкл из каждой пробы, добавьте к 10 мл сцинтиллятора Triton fluor[2] и определите общую радиоактивность (Т) на сцинтилляционном счетчике.
6. Отберите по 200 мкл из каждой пробы и добавьте к этой аликвоте 50 мкл БСА (100 мкг/мл) и затем 50 мкл 6 н. хлорной кислоты. Перемешайте и оставьте во льду на 30 мин. Отцентрифугируйте при 2000*g* 10 мин. Смешайте 200 мкл супернатанта с 10 мл сцинтиллятора Triton fluor и определите кислоторастворимую радиоактивность (S) на сцинтилляционном счетчике.

Процентное содержание ДНК-зонда в устойчивых к нуклеазе S1 гибридах вычисляют по формуле:

$$\text{Гибридизовавшаяся ДНК (в \%)} = \frac{T - 0{,}75S}{T} \cdot 100.$$

[1] Формамид деионизуйте следующим образом. Встряхивайте 100 мл формамида с 10 г смешанной смолы (например, Bio-Rad AG 501—X8(D) 2 ч при комнатной температуре. Отфильтруйте смолу и храните формамид при —20 °С.

[2] Для приготовления сцинтиллятора Tritton fluor растворите 0,75 г POPOP и 12,5 г PPO в 2,5 л толуола. Добавьте к этой смеси половинный объем тритона X-100.

тойчивой к нуклеазе S1, кДНК-зонд с длиной, меньшей, чем мРНК, даст заниженные оценки количества имеющейся РНК. Поэтому рекомендуется предварительно фракционировать [^{3}H]-кДНК центрифугированием в сахарозном градиенте, чтобы получить полноразмерные молекулы [25].

В табл. 7 описаны условия гибридизации, используемые в нашей лаборатории. В пробы с определенным количеством меченой кДНК добавляют увеличивающиеся количества РНК и количество гибридизовавшейся кДНК измеряют с помощью гидролиза нуклеазой S1 и последующего осаждения хлорной кислотой (табл. 7; [26]). С увеличением количества вносимой РНК процент гибридизующейся кДНК постепенно возрастает до максимальной величины (выходит на плато). Чтобы гибридизация прошла полностью, все реакции проводят как минимум до значения $R_0t = 10^{-1}$ моль·л$^{-1}$·с, поэтому кривая гибридизации достигает плато в точке, когда количество внесенного специфического РНК-транскрипта эквивалентно количеству имеющейся [^{3}H]-кДНК. Перед тем как проводить анализ количества специфических РНК-транскриптов, синтезированных in vitro, реко-

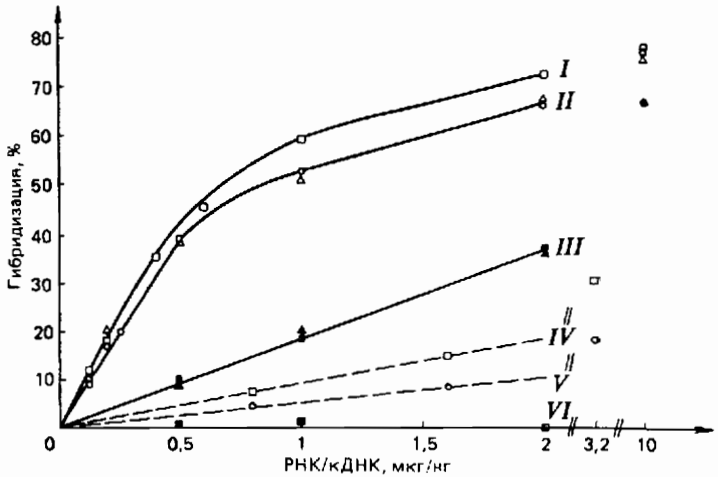


Рис. 1. Анализ насыщения гибридизации транскриптов, синтезированных РНК-полимеразой *E. coli* в системе с ядрами и хроматином печени плода мыши. Различные количества очищенных меркурированных РНК-транскриптов (табл. 6) гибридизовали с 0,05 нг радиоактивной глобиновой кДНК и определяли устойчивость кДНК к нуклеазе S1, как описано в табл. 7. Подробности можно найти в первой сноске к табл. 8. Приведенные кривые соответствуют: *I* — полная транскрипция в системе с ядрами; *II* (*светлые кружки*) — полная транскрипция в системе с ядрами в присутствии 10 мкг/мл α-аманитина; *II* (*светлые треугольники*) — полная транскрипция в системе с ядрами+10 мкг/мл α-аманитина+250 мкг/мл актиномицина D; *IV* — система с ядрами без добавления полимеразы; *V* — система с ядрами без добавления полимеразы+10 мкг/мл α-аманитина; *III* (*темные кружки*) — полная транскрипция в системе с хроматином; *III* (*темные треугольники*) — полная транскрипция в системе с хроматином+250 мкг/мл актиномицина D; *VI* (*темные квадраты*) — система с хроматином без добавления полимеразы.

мендуется предварительно построить калибровочную кривую с очищенной мРНК.

На рис. 1 и в табл. 8 приведены типичные результаты, полученные с использованием этого метода. В плане последующего обсуждения важно отметить, что на рис. 1 представлен лишь качественный анализ, с помощью которого характеризуется только тип синтезируемых РНК-транскриптов, тогда как их количественный выход не рассматривается. Вместе с тем в табл. 8 включены также данные, касающиеся выхода транскрипции при каждом наборе условий. Эти данные относятся к транскрипции in vitro глобиновых генов с использованием в качестве матрицы хроматина плода мыши, причем эту транскрипцию сравнивали с транскрипцией глобиновых генов в изолированных интактных ядрах. Условия транскрипции in vitro экзогенной РНК-полимеразой в ядрах идентичны условиям

Таблица 8. Определение содержания глобиновых РНК, синтезированных на матрицах в хроматине и в ядрах[1]

Условия транскрипции	Результат транскрипции, мкг РНК/мг ДНК	Глобиновая РНК в транскриптах, нг/мкг РНК	Глобиновые РНК-транскрипты в расчете на матрицу, нг глобиновой РНК/мг ДНК
Хроматиновые транскрипты			
—полимераза	—[2]	—[2]	—[2]
+полимераза	1,5	0,27	0,41
+полимераза+внесенная глобиновая мРНК[3]	1,5	0,36	0,54
+полимераза+актиномицин D[4]	0,3	0,31	0,09
Ядерные транскрипты			
—полимераза	—[2]	—[2]	0,17[5]
+полимераза+α-аманитин[6]	—[2]	—[2]	0,10[5]
+полимераза	1,31	1,16	1,52
+полимераза+α-аманитин	1,31	1,07	1,40
+полимераза+внесенная глобиновая мРНК[3]	1,14	1,94	2,21
+полимераза+актиномицин D[4]	0,30	1,07	0,32

[1] Метод выделения ядер приводится в табл. 1, пп. 1—3, а в последующих пунктах той же таблицы описано выделение хроматина (т. е. разрушенных и промытых солевым раствором ядер). Осадки ядер были ресуспендированы в растворе, имеющем состав: 5 мМ $MgCl_2$, 25% глицерола, 50 мМ трис-HCl, pH 7,9, 2 мг/мл ДНК. По 1 мл из каждой пробы инкубировали в системе транскрипции in vitro в условиях транскрипции на хроматине, описанных в табл. 5. Меркурированные РНК-транскрипты были очищены методом аффинной хроматографии на тиолированной сефарозе (табл. 6). Содержание транскриптов глобиновой РНК определяли с помощью меченой радиоактивной глобиновой кДНК-зонда, как это описано в табл. 7. Все цифры выведены из данных по насыщению, полученных в результате отдельных определений.

[2] Не измеряли.

[3] Добавлена экзогенная глобиновая мРНК (0,5 мкг/мг ДНК-матрицы).

[4] Актиномицин D, 250 мкг/мл.

[5] В этих случаях в качестве носителя добавляют тРНК *E. coli* и выделенную РНК титруют с кДНК для определения количества эндогенных глобиновых РНК-транскриптов.

[6] Концентрация α-аманитина 10 мкг/мл.

транскрипции в системе с хроматином (табл. 5). Добавляемая РНК-полимераза быстро проникает в ядра, и поэтому количество образующегося в этом случае РНК-транскрипта сравнимо с количеством, синтезируемым на хроматиновой матрице. На рис. 1 показано, что после инкубации ядер или хроматина в отсутствие РНК-полимеразы *E. coli* с глобиновой кДНК гибридизуется только очень небольшое количество РНК. Этот невысокий уровень гибридизации ядерной РНК в данных условиях отражает транскрипцию эндогенной РНК-полимеразой II, которая может быть частично ингибирована добавлением 10 мкг/мл α-аманитина. Когда инкубацию проводят в присутствии РНК-полимеразы *E. coli*, происходит значительное увеличение относительного количества транскрибированной глобино-

вой РНК, о чем судят по гибридизации, причем для ядерных матриц эти значения в три раза выше, чем для хроматиновой матрицы. Возросшая транскрипция при использовании ядер почти не меняется в присутствии α-аманитина; это свидетельствует о том, что значительное увеличение транскрипции глобинового гена связано с экзогенной РНК-полимеразой *E. coli*.

В табл. 8 приводится количественная оценка данных, представленных на рис. 1 (см. выше), а также результатов, полученных при проверке эффективности транскрипции глобиновой мРНК. Как и ожидалось, количество глобиновых РНК-транскриптов, образующихся на единицу веса матрицы (ДНК), при использовании ядер втрое выше, чем при использовании хроматина. Вероятно, специфичность транскрипции снижается из-за механической деградации и нарушения структуры хроматина, происходящих при его выделении. С точки зрения матричной специфичности естественно, что она должна быть максимальной в интактном ядре. Важным контролем служит эффект актиномицина D на транскрипцию in vitro. Как в случае хроматина, так и в случае ядер актиномицин D в концентрации 250 мкг/мл снижает выход суммарной РНК до 20% начальной величины (табл. 8). Однако среди РНК, синтезированных в результате остаточной транскрипции, последовательности глобиновой РНК составляют такую же долю, как и в отсутствие ингибирования (рис. 1, табл. 8, третья колонка). Поэтому можно думать, что эта остаточная транскрипция не является результатом аномального копирования последовательностей эндогенной мРНК, а представляет собой не полностью ингибированный актиномицином D обычный зависимый от ДНК синтез. Такая интерпретация подтверждается опытами, в которых доля образующихся глобиновых РНК-транскриптов меняется незначительно при внесении в инкубационные смеси довольно значительных количеств очищенной глобиновой мРНК. Небольшое количество дополнительных глобиновых РНК-«транскриптов» (табл. 8, третья колонка) и незначительная глобинспецифическая транскрипция, сохраняющаяся при ингибировании α-аманитином или актиномицином D (табл. 8), вероятно, представляют собой результат фоновой неспецифической адсорбции эндогенной РНК на тиолированной сефарозе; обычно ее величина составляет 0,05—0,10% эндогенной РНК.

5.2. Картирование сайтов инициации транскрипции с помощью нуклеазы S1

Описанный выше метод анализа с использованием кДНК позволяет количественно оценить генспецифическую транскрипцию. Однако он не несет информации о правильности процесса

копирования, т. е. о точной инициации транскрипции в нужных сайтах. Например, последовательности ДНК в хроматине, способные взаимодействовать с РНК-полимеразой, могут транскрибироваться более или менее случайным образом, а не со специфических сайтов инициации, как это происходит in vivo. К счастью, развитие метода картирования с помощью нуклеазы S1 [27, 28] и возможность получения клонированной ДНК, содержащей последовательность определенного гена, позволяют провести анализ сайта или сайтов инициации транскрипции.

5.2.1. Принцип картирования с помощью нуклеазы S1

Теоретически картирование с помощью нуклеазы S1 имеет два возможных варианта. Меченые ^{32}P-РНК-транскрипты можно гибридизовать с немеченой ДНК-зондом или немеченые РНК-транскрипты можно гибридизовать с меченой ^{32}P-ДНК-зондом. Первый вариант в определенных ситуациях является предпочтительным; он описан в гл. 3, разд. 3.3. Однако второй вариант дает более высокое разрешение, и мы здесь на нем остановимся.

Для локализации сайта инициации транскрипции этим методом необходим специфический геномный фрагмент рестрикции (ДНК-зонд), обычно охватывающий область, начиная с первого экзона изучаемого гена до некоторой точки, расположенной за предполагаемым сайтом инициации (кэп-сайтом) гена в направлении 5′-конца. Этот фрагмент рестрикции метят по концам ^{32}P, денатурируют и разделяют его цепи путем электрофореза в геле. Выделяют цепь, комплементарную исследуемой РНК, и ее избыток гибридизуют с немеченым препаратом РНК-транскрипта. РНК, гибридизовавшаяся с меченой ДНК-зондом, защитит от последующего гидролиза нуклеазой S1 часть зонда, лежащую в 3′-направлении от сайта инициации транскрипции (под 3′- и 5′-концами автор имеет в виду концы мРНК), но не защитит ту часть, которая находится перед точкой инициации. Точные размеры защищенного фрагмента ДНК определяют методом электрофореза в геле и сравнивают с размерами фрагмента, защищенного аутентичной мРНК. Если транскрипция in vitro была инициирована в правильном сайте, то фрагменты ДНК, защищенные РНК-транскриптами и аутентичной мРНК, будут одинаковыми по размерам. В противном случае размер фрагмента ДНК, защищенного РНК-транскриптами, укажет местоположение действительного сайта инициации in vitro. Важно отдавать себе отчет в том, что информативный ответ можно получить только в том случае, когда 5′-конец ДНК-зонда полностью защищен от деградации нуклеазой S1. Это обычно гарантируется, если 5′-конец ДНК-зонда относится

к последовательности в первом экзоне, т. е. находится вблизи начала кодирующего участка. Еще одно преимущество такого анализа состоит в том, что при этом сводятся к минимуму эффекты терминации.

5.2.2. Постановка эксперимента

Прописи выделения одноцепочечной ДНК-зонда, меченной ^{32}P, и использования этого зонда в S1-нуклеазном картировании приведены соответственно в табл. 9 и 10. S1-нуклеазное картирование не является непогрешимым диагностическим методом. Если используют слишком мало фермента, то среди истинных гибридов обнаруживают примесь гибридов с дефектом и получают сложный набор фрагментов, с трудом поддающихся идентификации. Чтобы преодолеть эту трудность, используют серии инкубационных проб с разным количеством нуклеазы S1 (табл. 10), начиная от проб, где фермента мало и где наблюдается неполный гидролиз гибридов, до проб с избытком фермента, когда примеси нуклеаз или, возможно, слишком жесткие условия вызывают разрушение даже истинных гибридов. Такое исследование обычно проводят одновременно с РНК, транскрибированной in vitro, и с аутентичной клеточной РНК, чтобы сравнить начальные точки расщепления гибридов.

Таблица 9. Приготовление меченой [^{32}P]-ДНК-зонда

1. Растворите 0,5—1,0 мкг ДНК-зонда[1] в 50 мкл 50 мМ трис-HCl, pH 8,5. Добавьте 1 ед. щелочной фосфатазы из кишечника теленка и проинкубируйте при 37 °С 30 мин для дефосфорилирования ДНК, после чего прогрейте смесь при 60 °С 5 мин, чтобы инактивировать фермент.
2. Проэкстрагируйте пробу равным объемом фенола, насыщенного этим буфером. Проэкстрагируйте водную фазу 200 мкл эфира. К водной фазе добавьте ацетат натрия до конечной концентрации 0,1 М и затем 3 объема этанола. Оставьте при —20 °С на ночь или при —70 °С на 30 мин, чтобы выпал осадок ДНК.
3. Осадите ДНК центрифугированием (10 000g 10 мин). Промойте осадок 75%-ным этанолом и лиофилизуйте его.
4. Растворите ДНК в 2,5 мкл 10 мМ трис-HCl, pH 8,0. Добавьте 17,5 мкл 1 мМ спермидина, 0,1 мМ ЭДТА, 20 мМ трис-HCl, pH 9,5. Проинкубируйте при 90 °С 2 мин и затем поместите в лед.
5. Добавьте 2,5 мкл 0,1 М $MgCl_2$, 50 мМ ДТТ, 50%-ного глицерола, 0,5 М трис-HCl, pH 9,5. Перемешайте и добавьте эту смесь к 125 мкКи [γ-^{32}P]-АТР (>5000 Ки/ммоль), предварительно лиофилизованного и растворенного в 2,5 мкл воды.
6. Добавьте 20 ед. полинуклеотидкиназы (PL Biochemicals) и проинкубируйте при 37 °С 30 мин.
7. Добавьте 12,5 мкл 7,5 М ацетата аммония
   5,0 мкл дрожжевой тРНК (2 мг/мл)
   90,0 мкл этанола

   Оставьте смесь в сухом льду на 10 мин и осадите ДНК центрифугированием (10 000g 5 мин).

8. Растворите осадок ДНК в 25 мкл воды и повторите осаждение ДНК согласно п. 7.
9. Промойте осадок ДНК 75%-ным этанолом. Растворите осадок в 80%-ном деионизованном формамиде[2], 2,5 мМ ЭДТА, 0,1 М трис-боратном буфере, pH 8,3.
10. Прогрейте при 90 °С 5 мин, чтобы денатурировать ДНК. Охладите до комнатной температуры и затем нанесите на 6%-ный полиакриламидный гель (длиной 40 см, толщиной 1 мм), приготовленный в 2,5 мМ ЭДТА, 0,1 М трис-боратном буфере, pH 8,3. Лунка должна иметь глубину 1 см и ширину 1 см. Проведите электрофорез в том же буфере, в котором приготовлен гель, при 150 В в течение 24 ч при комнатной температуре.
11. Определите положение разделенных цепей[3] ДНК путем кратковременной радиоавтографии при комнатной температуре. Для этого заверните влажный гель (оставив его на одной из стеклянных пластинок после электрофореза) в тонкую пластиковую пленку. В темной фотокомнате положите на гель рентгеновскую пленку (например, Fuji RX), оставьте ее на ~2 мин и затем проявите.
12. Вырежьте полоски геля, содержащие цепи ДНК, в соответствии с радиоавтографом. Элюируйте ДНК из каждой полоски отдельно следующим образом. Размельчите полоску геля в 0,2 мл 1%-ного ДСН, 0,2 М ацетата натрия, pH 4,8 и проинкубируйте при 37 °С 16 ч.
13. Удалите кусочки геля центрифугированием. Осадите элюированную ДНК этанолом (табл. 5, пп. 4 и 5). Каждый осадок ДНК растворите в 50 мкл воды.
14. Определите, какая из цепей ДНК комплементарна изучаемому РНК-транскрипту. Наиболее простой способ сделать это — провести предварительную гибридизацию по методу, описанному в табл. 10, но с меченой мРНК. Другой вариант заключается в секвенировании ДНК [29].

[1] Наиболее подходящими для S1-нуклеазного картирования являются ДНК-зонды с длиной 200—1000 bp.

[2] Формамид деионизуйте способом, описанным в первой сноске к табл. 7.

[3] Две цепи молекулы ДНК обычно разделяются в таком геле в силу различий их вторичной структуры, зависящих от последовательности оснований. Однако бывает, что этих конформационных различий недостаточно, чтобы произошло разделение. В таком случае нужно использовать либо другой фрагмент ДНК, цепи которого разделяются, либо, если это невозможно, использовать в качестве зонда двухцепочечную ДНК. Поскольку гибридизацию, предшествующую картированию нуклеазой S1, проводят в условиях избытка ДНК (табл. 10, п. 1), некоторое количество ДНК будет гибридизоваться с РНК-транскриптами, что позволит провести картирование, хотя будет происходить также ренатурация цепей ДНК-зонда.

На рис. 2 показано применение S1-нуклеазного картирования для анализа транскрипции in vitro эпсилон (ε)-глобинового гена человека РНК-полимеразой *E. coli* с использованием в качестве матрицы хроматина и ядер эритролейкемических клеток К562 человека, которые конститутивно синтезируют ε-глобин. На рис. 2, *А* показана область клона геномной ДНК, содержащего ε-глобиновый ген в плазмиде pMX [31]. Удобным зондом для S1-нуклеазного картирования является *Mbo* II-фрагмент (371 bp), поскольку он охватывает область, начинающуюся внутри первого экзона ε-глобинового гена и продолжающуюся в 5′-сторону от предполагаемого сайта инициации, или кэп-сайта. На рис. 2, *Б* показано использование *Mbo* II-фрагмента, меченного по 5′-концу, для анализа транскрибированной in vitro РНК в системе, где в качестве матриц использовали ядра

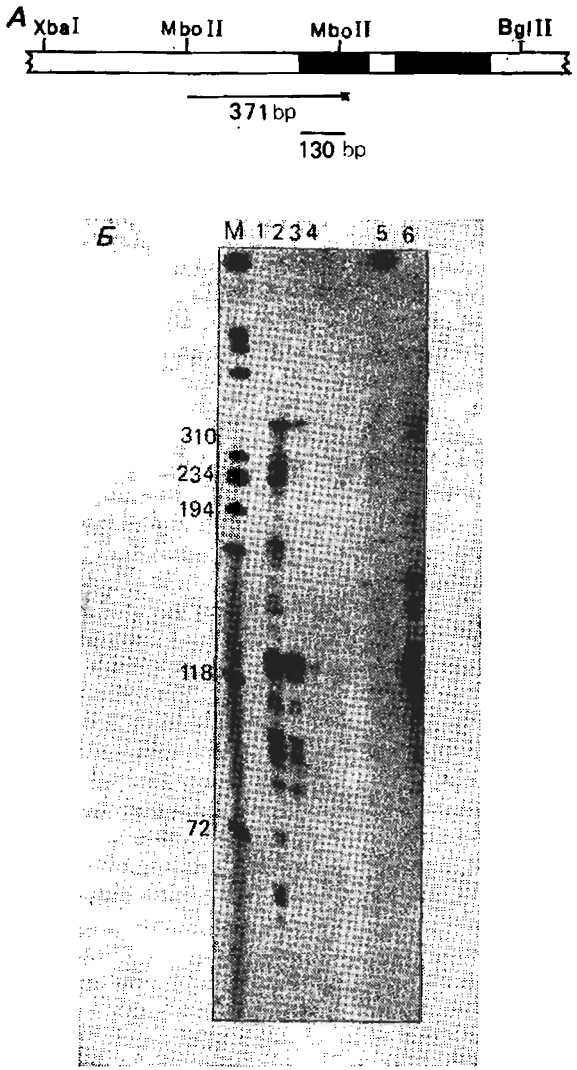


Рис. 2. Идентификация методом S1-нуклеазного картирования сайта инициации синтеза ε-глобиновой РНК человека in vitro. *А*. Рестрикционная карта части рекомбинантной плазмиды pMX [31], на которой показан район геномной ДНК человека, содержащий точку инициации транскрипции ε-глобинового гена человека. Черные блоки представляют собой экзоны, слева — первый экзон, справа — второй. Фрагмент длиной 371 bp, полученный при расщеплении рестриктазой *Mbo*II фрагмента *Xba*I-*Bgl*II, был помечен по 5′-концу, и кодирующая (+)-цепь (371 нуклеотид), показанная на рисунке, была выделена (табл. 9) и использована в качестве ДНК-зонда для S1-нуклеазного картирования сайта инициации транскрипции РНК in vitro. Показано по-

(продолжение см. на следующей странице)

или хроматин, выделенные из клеток К562. На первой и второй дорожках представлены ДНК, устойчивые к нуклеазе S1, после гибридизации кодирующей (+)-цепи *Mbo* II-фрагмента соответственно с ядерными и хроматиновыми РНК-транскриптами. Дорожка 6 показывает результат аналогичного анализа суммарной РНК клеток К562. Во всех случаях видны два одинаковых главных защищенных фрагмента с размерами около 130 нуклеотидов каждый. Это означает, что сайт инициации транскрипции находится на расстоянии приблизительно 130 нуклеотидов от *Mbo* II-сайта в первом экзоне (рис. 2, *А*). Предполагают, что наличие двух фрагментов связано с гетерогенностью S1-нуклеазного гидролизата или самого сайта инициации in vitro. Как видно на дорожках 3 и 4, в отсутствие РНК-полимеразы в реакционных смесях транскрипции in vitro защищенность ДНК-зонда от расщепления очень невелика. Поскольку в инкубационные смеси на дорожках 1 и 2 был внесен α-аманитин, в анализируемых в них РНК гарантируется отсутствие продукта остаточной активности РНК-полимеразы II. Действительно, синтез специфических ε-глобиновых транскриптов можно подавить внесением 400 мкг/мл рифампицина, что свидетельствует о том, что наблюдаемая транскрипция является результатом инициации de novo экзогенной РНК-полимеразой *E. coli*. Стоит отметить, что для получения одинакового количества гибридов, устойчивых к нуклеазе S1, хроматина клеток К562 требуется в 5 раз больше, чем ядер. Следовательно, хроматин является гораздо менее эффективной матрицей для РНК-полимеразы *E. coli*, тогда как сайты инициации транскрипции ε-глобинового гена in vitro для обеих матриц одинаковы. Во всех случаях транскрипция является асимметричной, поскольку с некодирующей (—)-цепью *Mbo* II-ДНК-зонда гибридизации не наблюдается (данные не показаны).

ложение фрагмента (130 нуклеотидов), защищенного от расщепления нуклеазой S1 (см. ниже). *Б.* Эритролейкемические клетки К562 индуцированы 1 мМ гемином в течение 5 дней и использованы для выделения ядер и хроматина (табл. 1). Меркурированная РНК была синтезирована in vitro в системе с ядрами или хроматином клеток К562 (табл. 5), а затем очищена (табл. 6). Описанную выше в *А* ДНК-зонд, взятую в избытке, гибридизовали с РНК-транскриптами, обрабатывали нуклеазой S1 и затем защищенные фрагменты зонда разделяли электрофорезом и выявляли с помощью радиоавтографии, как описано в табл. 10. Дорожки 1 и 3 — меркурированная РНК из ядер клеток К562 (1 мг ДНК), инкубированных в присутствии 10 мкг/мл α-аманитина соответственно с добавлением или без добавления 200 ед. РНК-полимеразы *E. coli*; дорожки 2 и 4 — меркурированная РНК из хроматина клеток К562 (5 мг ДНК), инкубированного с 10 мкг/мл α-аманитина соответственно с добавлением или без добавления 200 ед. РНК-полимеразы *E. coli*; дорожка 5 — РНК, синтезированная на ДНК pATHεG (20 мкг), инкубированной со 100 ед. РНК-полимеразы *E. coli*; дорожка 6 — 10 мкг суммарной РНК клеток К562.

Таблица 10. Картирование немеченых РНК-транскриптов с помощью нуклеазы S1[1]

1. Прогибридизуйте каждую пробу немеченых РНК-транскриптов с соответствующей одноцепочечной [^{32}P]-ДНК-зондом (приготовленной, как описано в табл. 9) в условиях избытка ДНК[2]. Проведите гибридизацию при 57 °С 16 ч в 10 мкл 80%-ного деионизованного формамида[3], 0,4 М NaCl, 1 мМ ЭДТА, 40 мМ PIPES (pH 6,4, доводится NaOH). Вначале, чтобы определить оптимальные условия для картирования нуклеазой S1, рекомендуется поставить серию гибридизаций (см. п. 3 ниже).
2. После гибридизации добавьте 200 мкл охлажденной во льду смеси: 0,25 М NaCl, 200 мкг/мл денатурированной ДНК тимуса теленка, 1 мМ $ZnSO_4$, 30 мМ ацетат натрия, pH 4,6.
3. Проинкубируйте смесь в различных условиях гидролиза нуклеазой S1, чтобы определить наиболее подходящую систему для каждого случая (разд. 5.2.2). Как правило, проводят серию гибридизаций при 10, 20 или 40 °С с 2000 ед. нуклеазы S1 1, 2 или 5 ч.
4. Осадите нуклеиновую кислоту этанолом, как описано в табл. 5, пп. 4 и 5.
5. Растворите осадок ДНК в небольшом объеме 80%-ного формамида[3], 1%-ного бромфенолового синего, 2,5 мМ ЭДТА, 0,1 М трис-боратного буфера, pH 8,3.
6. Определите размеры устойчивых к нуклеазе S1 гибридных молекул методом электрофореза в 6%-ном полиакриламидном секвенирующем геле. Подробности метода приготовления геля приведены в разд. 3 обзора [29], где описано приготовление 8%-ного секвенирующего геля. Для 6%-ных гелей в этом обзоре приведен следующий состав исходного раствора:

   120 мл 50%-ного акриламида, 2%-ного бисакриламида
   460 г мочевины
   100 мл 2,5 мМ ЭДТА, 0,1 М трис-боратного буфера, pH 8,3
   вода до 1 л

   Чтобы приготовить 6%-ный гель, смешайте:

   60 мл исходного раствора
   100 мкл TEMED
   400 мкл 10%-ного персульфата аммония

   Залейте пипеткой гелевую смесь между двумя стеклянными пластинами (20×40 см) с зазором 1 мм и погрузите в гель шаблон. После полимеризации выньте шаблон, прогрейте пробы при 60 °С 15 мин и нанесите по 5 мкл каждой пробы в отдельные лунки, пользуясь пипеткой с тонким оттянутым кончиком. Проводите электрофорез в геле (вертикально) в 2,5 мМ ЭДТА, 0,1 М трис-боратном буфере, pH 8,3, при постоянной мощности 42 Вт (1400 В и 30 мА) до тех пор, пока бромфеноловый синий не пройдет 35 см. Во время электрофореза температура геля должна быть ~60 °С.
7. После электрофореза перенесите гель на лист фильтровальной бумаги Whatman № 3 и высушите его с помощью специального приспособления для сушки гелей (например, фирмы Bio-Rad) 1 ч. В темной фотокомнате положите на высушенный гель лист пленки Kodak X-OMAT или Fuji RX и поместите этот «сэндвич» в кассету для радиоавтографии. Экспонируйте 1—7 дней при —70 °С.

   Размеры защищенного фрагмента ДНК дают полезную информацию относительно сайта инициации in vitro (разд. 5.2.1), но точный сайт инициации определяют методом электрофореза на том же геле набора реакционных смесей Максама и Гилберта [30], полученных с использованием той же меченой ДНК-зонда. Нуклеотидной последовательности сайта инициации транскрипции in vitro соответствует та полоса в «лестнице» последовательностей, которая совпадает по положению с полосой защищенного фрагмента.

[1] Альтернативный метод приведен в гл. 2, табл. 6.
[2] Важно, что концентрация одноцепочечной ДНК-зонда была избыточной по сравнению с гибридизующейся РНК. Чтобы гарантировать это, рекомендуется провести серию предварительных гибридизаций (табл. 7), в каждой из которых используют разное количество ДНК. Ясно, что в условиях избытка ДНК дальнейшее увеличение количества вносимой ДНК не влияет на количество радиоактивного гибридизовавшегося РНК-транскрипта. При всех гибридизациях суммарное количество присутствующей нуклеиновой кислоты доводят до 50 мкг путем добавления дрожжевой тРНК.
[3] Формамид деионизуйте способом, описанным в первой сноске к табл. 7.

6. Обоснованность применения РНК-полимеразы *E. coli*

Исследования с использованием РНК-полимеразы *E. coli* доступных последовательностей ДНК в матрицах были прекращены после того, как Заслоф и Фелсенфелд [19] показали, что многие опыты, в которых этот фермент использовали в присутствии ионов марганца, давали искаженные, артефактные результаты, обусловленные РНК-зависимой транскрипцией этим ферментом (разд 4.1). Как описано выше, использование меркурированных нуклеотидов обеспечивает надежный метод выделения РНК, синтезированной in vitro на хроматине в правильно выбранных ионных условиях синтеза. В этих условиях РНК-полимераза *E. coli* и на ядрах, и на хроматине, выделенных из клеток млекопитающих, синтезирует транскрипты, которые очень похожи на продукты, образуемые эндогенной РНК-полимеразой II [23, 32]. По-видимому, инициация РНК-полимеразой *E. coli* как на ядерной, так и на хроматиновой матрицах происходит точно на тех же сайтах, что и in vivo.

В силу того что между *E. coli* и млекопитающими лежит большая эволюционная пропасть, на самом деле кажется маловероятным, чтобы РНК-полимераза *E. coli* узнавала такие же сигналы инициации, как и РНК-полимераза II в клетках млекопитающих. Более того, хотя между Прибноу-боксом в прокариотической ДНК и ТАТА-боксом в эукариотической ДНК существует большое сходство, расстояния между этими последовательностями и сайтом инициации различны: около 12 bp у прокариот и 25—30 bp у эукариот. Поэтому удивительно, что по крайней мере на ядрах и хроматине клеток К562 РНК-полимераза *E. coli* инициирует транскрипцию главным образом в том же основном сайте инициации, что и эндогенная РНК-полимераза II. Вероятно, доступность активного ε-глобинового гена для бактериального фермента определяется конформацией хроматина вокруг сайта инициации. Это подтверждается тем, что РНК, транскрибированная РНК-полимеразой *E. coli* на лишенной белков плазмидной ДНК, содержащей последовательности ε-глобинового гена, не дает специфической гибридизации с *Mbo* II-ε-глобиновой ДНК-зондом (рис. 2, *Б*, дорожка 5).

Дальнейшее изучение этого явления, возможно, позволит углубить представление о конформации хроматина в промоторных сайтах млекопитающих.

7. Фракционирование и реконструкция хроматина

Для того чтобы понять характер взаимодействий, определяющих известные структурные и биологические свойства хроматина, в течение последних 10 лет предпринимались различные попытки фракционировать хроматин и вновь собирать его in vitro из компонентов.

7.1. Фракционирование хроматина

Описано очень много методов разделения хроматина на отдельные компоненты. Почти во всех случаях для отделения белков хроматина от ДНК используют высокие концентрации соли, часто в присутствии денатурирующих агентов, таких, как мочевина или гуанидинийхлорид. Например, белки хроматина можно выделить путем диссоциации хроматина в 2 М NaCl, 5 М мочевине с последующим ультрацентрифугированием для осаждения ДНК [33, 34]. Далее белки можно фракционировать с помощью ряда методов. При этом, однако, из белковой фракции не удаляется РНК. Альтернативная методика, при которой из белков хроматина удаляют и РНК, и ДНК, включает ультрацентрифугирование в 27%-ном (по весу) CsCl и 4 М мочевине [35].

Хроматин можно также фракционировать, не прибегая к длительному ультрацентрифугированию, а используя хроматографию на гидроксиапатите [36, 37]. Это один из немногих одноступенчатых методов разделения хроматина на составляющие компоненты, описание которого дано в табл. 11. По этому методу ДНК, негистоновые белки (нГБ) и РНК адсорбируются на колонке с гидроксиапатитом в 2 М NaCl, 5 М мочевине, тогда как гистоны на ней не задерживаются. При элюции различными концентрациями фосфата натрия ДНК и нГБ выходят по отдельности; при этом происходит также частичное разделение самих белков. Однако в данном методе эндогенная ядерная РНК и масса нГБ не разделяются. Гистоны и нГБ могут быть разделены на Bio-Rex 70 [38].

Альтернативный подход заключается в раздельном выделении различных компонентов хроматина. Так, высокомолекулярную ДНК можно выделить по методу Шамбона [39], гистоны — солевой экстракцией [40], а нГБ можно экстрагировать из хроматина 6 М мочевиной, 50 мМ фосфатным буфером, pH 7,5 [41, 46].

Таблица 11. Фракционирование хроматина[1]

1. Гомогенизируйте хроматин (выделенный согласно табл. 1) в буфере для хроматина (2 М NaCl, 5 М мочевина, 1 мМ фосфат натрия, pH 6,8) с помощью гомогенизатора с тефлоновым пестиком при концентрации ДНК 0,5 мг/мл.
2. Отцентрифугируйте при 15 000*g* 15 мин и супернатант сохраните.
3. Гомогенизируйте осадок еще раз, как в п. 1.
4. Отберите супернатант и объедините его с супернатантом, полученным после центрифугирования в п. 2.
5. Обработайте супернатанты ультразвуком (2 раза по 15 с), например на ультразвуковом дезинтеграторе MSE при 1,5 А.
6. Отцентрифугируйте при 15 000*g* 15 мин.
7. Нанесите 50—100 мл супернатанта на колонку (16×25 см) с гидроксиапатитом (Bio-Rad Labs.), уравновешенную буфером для хроматина, самотеком со скоростью протекания 5—10 мл/ч.
8. а) После нанесения промывайте колонку буфером для хроматина до тех пор, пока не перестанут элюироваться несвязавшиеся гистоны.
   б) Затем элюируйте негистоновые белки в двух фракциях, промывая колонку последовательно буфером для хроматина, содержащим 50 мМ натрийфосфат, pH 6,8, и тем же буфером, содержащим 0,2 М натрийфосфат, pH 6,8[2]. Вторая фракция негистоновых белков, которая элюируется при более высокой концентрации соли, содержит основную массу хромосомной РНК. Маленькая дополнительная фракция сильно связанных негистоновых белков может быть элюирована буфером для хроматина, содержащим 2 М гуанидинийхлорид.
   в) Наконец, элюируйте ДНК, промывая колонку буфером для хроматина, содержащим 0,5 М натрийфосфат, pH 6,8.

[1] За основу взят оригинальный метод [36]. Из хроматина, содержащего до 10 мг ДНК, материал извлекается практически количественно.

[2] Другой вариант — использование градиента концентрации фосфата натрия. При этом негистоновые белки элюируются несколько лучше, чем в методе со ступенчатой элюцией.

7.2. Реконструкция хроматина

Различные методы, которые были использованы для избирательной реконструкции хроматина из составляющих компонентов, приведены в ряде обзоров [8, 42, 43]. Основная про-

Таблица 12. Реконструкция хроматина

1. Смешайте высокомолекулярную ДНК (0,5 мг/мл) с хромосомными белками в отношении 1 : 1,5 для гистонов и 1 : 0,5 для негистоновых белков в 2 М NaCl, 5 М мочевине, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0.
2. Отдиализуйте смесь для реконструкции против 20 объемов этого буфера при 4 °С 2 ч.
3. Постепенно снижайте концентрацию солн в смеси последовательным диализом (по 2 ч каждый) против 1 мМ PMSF, 10 мМ трис-HCl, pH 6,8 с 2,0 М, 1,0 М, 0,8 М, 0,6 М, 0,4 М и 0,2 М NaCl. Обратите внимание, что мочевина не входит в буферы для диализа.
4. Осадите нерастворимый реконструированный нуклеопротеин центрифугированием при 2000*g* 10 мин. Промойте его осадок 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0.

пись одна и та же, независимо от тонкостей выбранного метода. Пробы диссоциированного хроматина или разделенных компонентов смешивают в стехиометрических количествах при высокой ионной силе и затем концентрацию соли постепенно понижают до физиологической путем диализа в течение нескольких часов. Эти операции можно проводить в присутствии мочевины, а можно без нее. Стандартная пропись для реконструкции хроматина приводится в табл. 12.

7.3. Точность реконструкции

Благодаря ряду структурных исследований с применением тепловой денатурации [44], кругового дихроизма [45], дифракции рентгеновских лучей [46] и нуклеазного гидролиза [47] было выяснено, что реконструированный хроматин может приобретать некоторые структурные свойства нативного хроматина. Биологическую точность реконструкции можно оценить путем транскрипции in vitro реконструированного хроматина экзогенной РНК-полимеразой *E. coli* (разд. 4.2). РНК-транскрипты можно проанализировать методом гибридизации со специфическими кДНК-зондами (разд. 5.1) и методом картирования с нуклеазой S1 (разд. 5.2) и затем сравнить их с транскриптами, полученными на нативном хроматине. Одна из главных погрешностей этого метода заключается в неизбежном повторном включении эндогенной РНК в хроматин в процессе реконструкции. Однако использование меркурированных нуклеотидов позволяет прямо выделять транскрипты, образованные in vitro на матрицах реконструированного хроматина (разд. 4.2). Методом гибридизации с кДНК было проведено сравнение меркурированных транскриптов, полученных с использованием в качестве матрицы нативного и реконструированного хроматина печени зародыша мыши [1, 43]. В этих исследованиях показано, что количество глобиновых РНК-транскриптов, синтезированных на реконструированном хроматине, было промежуточным между количеством, ожидаемым при случайном синтезе на ДНК, лишенной белков, и на нативном хроматине. При сравнении препаратов хроматина, реконструированного при различных концентрациях соли и мочевины (разд. 6.2), было обнаружено, что степень точности реконструкции, которую оценивали путем анализа специфических транскриптов, варьирует [1]. Дальнейшее исследование этих матриц методом электронной микроскопии подтвердило, что ни один из проверенных методов реконструкции, если судить по неупорядоченному образованию нуклеосом, не является особенно эффективным [1]. Кроме того, наблюдались протяженные участки ДНК, лишенной белков, а местами большие аморфные скопления ДНК

и белка. Эти данные можно объяснить, предположив, что для правильного восстановления структуры нуклеосом нужна определенная временна́я последовательность специфических гистон-гистоновых взаимодействий. Присутствие мочевины во время реконструкции подавляет эти взаимодействия, а удаление ее на конечных этапах реконструкции приводит лишь к общему неспецифическому взаимодействию ДНК с гистонами. В ряде работ по реконструкции нуклеосом in vitro [48, 49], в которых использовали изолированные гистоны, показано, что в этом процессе важную роль играют промежуточные продукты: гистоновый тетрамер (H3-H4) и гистоновый димер (H2A-H2B). Однако даже при строго контролируемых условиях сборка нуклеосом является неполной [48]. Точная реконструкция хроматина была продемонстрирована in vitro только с экстрактами из ооцитов *Xenopus* [50] и с геномами SV40, выделенными из клеток, инфицированных SV40 [51].

В целом роль образования нуклеосом как фактора, определяющего специфичность транскрипции, не ясна. Тот факт, что препараты эукариотической РНК-полимеразы II содержат белки, направляющие инициацию путем узнавания промоторных последовательностей ДНК, заставляет предполагать, что для функционирования регуляторных механизмов полной реконструкции хроматина, возможно, не требуется [52].

Литература

1. *Gilmour R. S.* In: The Cell Nucleus, vol. 6, Busch H. (ed.), Academic Press, New York and London, p. 329, 1978.
2. *Axel R., Cedar H., Felsenfeld G.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**, 2029 (1973).
3. *Gilmour R. S., Paul J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**, 3440 (1973).
4. *Steggles A. W., Wilson G. W., Kantor J. A., Picciano D. L., Falvey A. K., Anderson F. W.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **71**, 1219 (1974).
5. *Barret T., Maryanka D., Hamlyn P. H., Gould H. J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **71**, 5057 (1974).
6. *Chiu J. F., Tsai Y. H., Sakuma K., Hnilica L. S.* J. Biol. Chem., **250**, 9431 (1975).
7. *MacGillivray A. J.* In: Subnuclear Components, Birnie G. D. (ed.), Butterworths, London, p. 209, 1976.
8. *Stein G. S., Stein J. L.* In: Methods in Cell Biology, vol. 19, Stein G., Stein J. S. and Kleinsmith L. J. (eds.), Academic Press, Inc., New York and London, p. 379, 1978.
9. *Manley J. L., Fire A., Cano A., Sharp P. A., Gefter M. L.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 3855 (1980).
10. *Burgess R. R.* J. Biol. Chem., **244**, 6160 (1969).
11. *Hondo H. G., Blatti S. P.* Biochemistry (Wash), **16**, 2334 (1977).
12. *Bautz E. I. C. R., Dunn J. J.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **34**, 230 (1969).
13. *Smith S. S., Brown R.* Eur. J. Biochem., **82**, 309 (1978).
14. *Smith M. M., Huang R. C. C.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 755 (1976).

15. *Crouse G. F., Fodor E. J., Doty P.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 1564 (1976).
16. *Biesmann H., Gjerset R. A., Levy W. B., McCarthy B. J.* Biochemistry (Wash.), 15, 4356 (1976).
17. *Beebee T. J. C., Butterworth P. H. W.* Eur. J. Biochem., 66, 543 (1964).
18. *Towle H. C., Tsai M. J., Tsai S. Y., O'Malley B. W.* J. Biol. Chem., 252, 2396 (1976).
19. *Zasloff M., Felsenfeld G.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 75, 598 (1977).
20. *Zasloff M., Felsenfeld G.* Biochemistry (Wash.), 16, 5135 (1977).
21. *Giesecke K., Sippel A. E., Nguyen—Hu M. C., Groner B., Hynes N. E., Wurtz T., Schutz G.* Nucleic Acids Res., 4, 3943 (1977).
22. *Pays E., Donaldson D., Gilmour R. S.* Biochim. Biophys. Acta, 562, 112 (1979).
23. *Pays E., Gilmour R. S.* Biochim. Biophys. Acta, 653, 356 (1981).
24. *Van Brockhoven C., De Wachter R.* Nucleic Acids Res., 5, 2133 (1978).
25. *Harrison P. R., Birnie G. D., Hell A., Humphries S., Young B. D., Paul J.* J. Mol. Biol., 84, 539 (1974).
26. *Young B. D., Harrison P. R., Gilmour R. S., Birnie G. D., Hell A., Humphries S., Paul J.* J. Mol. Biol., 84, 555 (1974).
27. *Berk A. J., Sharp P. A.* Cell, 12, 421 (1977).
28. *Weaver R. F., Weissman C.* Nucleic Acids Res., 6, 1175 (1979).
29. *Davies R. W.* In: Gel Electrophoresis of Nucleic Acids — A Practical Approach, Rickwood D. and Hames B. D. (eds.), IRL Press Ltd., Oxford and Wachington, DC, p. 117, 1982.
30. *Maxam A. M., Gilbert W.* In: Methods in Enzymology, vol. 65, Grossman L. and Moldave K. (eds.), Academic Press Inc., New York, London, p. 39, 1980.
31. *Alan M., Grindlay G. J., Stefani L., Paul J.* Nucleic Acids Res., 10, 5133 (1982).
32. *Brown D. K. T., Pregnell I. B., Paul J.* Eur. J. Biochem., 104, 459 (1980).
33. *Graziano S. L., Huang R. C.* Biochemistry (Wash.), 10, 4470 (1971).
34. *Gadski R. A., Chae C. B.* Biochemistry (Wash.), 15, 3812 (1976).
35. *Gilmour R. S., Paul J.* In: Chromosomal Proteins and their Role in the Regulation of Gene Expression, Stein G. S. and Kleinsmith L. J. (eds.), Academic Press Inc., New York and London, p. 19, 1975.
36. *MacGillivray A. J., Cameron A., Krause R., Rickwood D., Paul J.* Biochim. Biophys. Acta, 277, 384 (1972).
37. *Rickwood D., MacGillivray A. J.* Eur. J. Biochem., 51, 593 (1975).
38. *Morris M., Gould H. J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68, 481 (1971).
39. *Chambon P.* Eur. J. Biochem., 36, 32 (1973).
40. *Noll M., Zimmer S., Engel A., Dubochet J.* Nucleic Acids Res., 8, 21 (1980).
41. *Barrett T., Maryanka D., Hamlyn P. H., Gould H. J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 5057 (1974).
42. *Gilmour R. S.* In: Methods in Cell Biology, vol. 19, Stein G., Stein J. S. and Kleinsmith L. J. (eds.), Academic Press Inc., New York, London, p. 373, 1978.
43. *Gould H. J., Maryanka D., Fey S. J., Cowling G. J., Allan J.* In: Methods in Cell Biology, vol. 19, Stein G., Stein J. S. and Kleinsmith L. J. (eds.), Academic Press Inc., New York and London, p. 387, 1978.
44. *Kleiman L., Huang R. C.* J. Mol. Biol., 64, 1 (1972).
45. *Boseley P. G., Bradbury E. M., Butler—Browne G. S., Carpenter B. G., Stpehens R. M.* Eur. J. Biochem., 62, 21 (1976).
46. *Richards M., Pardon J. F.* Exp. Cell Res., 62, 184 (1970).
47. *Axel R., Melchior W., Solner-Webb B., Felsenfeld G.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 4101 (1974).
48. *Oudet P., Gross—Bellard M., Chambon P.* Cell, 4, 181 (1975).
49. *Ruiz—Carrillo A., Jorcano J. L.* Biochemistry (Wash.), 18, 760 (1979).
50. *Laskey R. A., Mills A. D., Morris N. R.* Cell, 10, 237 (1977).
51. *Griffith J.* Science (Wash.), 187, 1202 (1975).
52. *Davison B. L., Egly J. M., Mulvihill E. R., Chambon P.* Nature, 301, 680 (1983).

ПРОКАРИОТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ IN VIVO

Н. Стоукер, Дж. Пратт, Б. Холланд

1. Введение

В этой главе описаны три основные прокариотические системы экспрессии in vivo: система клеток-хозяев, облученных УФ-светом, «мини-клетки» и «макси-клетки». Все это сопряженные системы транскрипции и трансляции. Они будут обсуждаться в применении к клеткам *Escherichia coli* и фагу λ. Системы с использованием других видов бактерий или фагов мы рассмотрим лишь в общих чертах.

1. *Система клеток-хозяев, облученных УФ-светом.* Клетки *E. coli* облучают большими дозами УФ-света, чтобы снизить до минимума синтез белка в хозяйских клетках, а затем заражают фагом λ, несущим клонированные гены. В среду для дальнейшей инкубации добавляют [^{35}S]-метионин, чтобы пометить кодируемые фагом белки, и продукты анализируют в ПААГ в присутствии ДСН. Систему можно еще более усовершенствовать, если блокировать синтез большинства белков фага λ. Для этого используют хозяйские клетки, лизогенные по фагу λ или несущие плазмиду, кодирующую репрессор транскрипции фага λ — продукт гена *c*I.

2. *Система мини-клеток.* Существует мутантный штамм *E. coli* (*min*A, *min*B), который образует большое количество мелких безъядерных клеток (мини-клеток), причем плазмиды, присутствующие в бактериях, попадают в эти клетки. Поскольку в них нет хромосомной ДНК, инкубация очищенных мини-

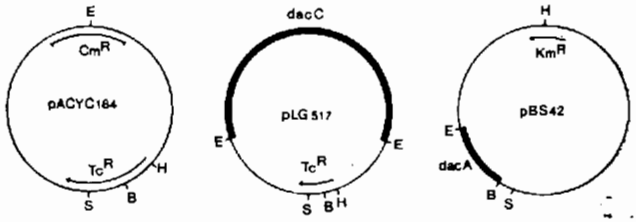


Рис. 1. Карты плазмид, рассмотренных в настоящей главе в качестве примеров. Жирные черные полоски — участки клонированной ДНК. Сайты расщепления ферментами рестрикции обозначены следующим образом: B — *Bam*HI; E — *Eco*RI; H — *Hind*III; S — *Sal*I. Остальные детали приведены в табл. 2.

Таблица 1. Достоинства и недостатки прокариотических систем экспрессии генов in vivo и in vitro

Система	Достоинства	Недостатки
Хозяйские клетки, облученные УФ-светом и зараженные фагом λ	1. Фаг λ часто используется на начальных стадиях клонирования генов. Это особенно важно для таких генов, которые, присутствуя в клетке более чем в одной копии, губительны для нее. При этом использование обычного многокопийного плазмидного вектора либо вообще не даст необходимых клонов, либо с высокой вероятностью приведет к клонированию гена с мутацией, снижающей его губительное действие на клетку.	1. Использование системы, естественно, ограничивается векторами на основе фага λ. 2. Остаточный фоновый синтез хозяйских полипептидов с мол. массой ниже 20 кДа может помешать обнаружению продуктов клонированного гена в этом диапазоне мол. масс 3. Меченые аминокислоты включаются со сравнительно низкой эффективностью, поэтому для обнаружения меченых продуктов необходимы флюорография и длительные экспозиции
Мини-клетки	1. Высокая эффективность включения меченых аминокислот. 2. Очищенные мини-клетки можно хранить в течение не менее года. 3. В принципе мини-клетки можно использовать для изучения генов, клонированных в любых плазмидных и фаговых векторах.	1. Большое число копий некоторых генов, клонированных в плазмидах, может нарушить образование мини-клеток и/или помешать их эффективной очистке. 2. Введение дополнительных мутаций (например, *rec* A) в штамм-продуцент мини-клеток может приводить к тем же последствиям. 3. Мини-клетки трудно фракционировать.
Макси-клетки	1. Простая процедура. 2. Система проще, чем мини-клетки, для проверки большого числа плазмид.	
Система синтеза белка in vitro, разработанная Зыоби	1. Может использоваться для любой клонированной ДНК, в том числе для небольших линейных фрагментов. Это позволяет однозначно соотнести продукты клонированной ДНК со сравнительно небольшими ее участками и отличить их от продуктов, кодируемых вектором.	1. Систему довольно трудно отладить. 2. Интерпретация результатов часто затруднена из-за присутствия продуктов абортивной трансляции и/или протеолитического расщепления, особенно в случае больших белков (>60 кДа).

Продолжение

Система	Достоинства	Недостатки
	2. Весьма эффективное включение метки позволяет быстро анализировать продукты. 3. Может использоваться для изучения экспрессии генов. 4. Имеет значительные преимущества в тех случаях, когда необходимо идентифицировать продукты неохарактеризованного гена.	

клеток в присутствии [^{35}S]-метионина позволяет избирательно пометить белки, кодируемые плазмидой.

3. *Система макси-клеток.* Клетки УФ-чувствительного штамма *E. coli* облучают небольшой дозой УФ-света, и поврежденная ДНК быстро деградирует во время последующей инкубации. Благодаря небольшому размеру мишени по сравнению с бактериальной хромосомой часть плазмидных молекул уцелеет при такой обработке. Поэтому введение [^{35}S]-метионина в сре-

Таблица 2. Характеристики некоторых плазмид[1]

Плазмида	Размер, kb	Число копий (на один бактериальный геном)	Гены	Продукты генов и их мол. масса
pACYC184	4,0	18	Устойчивость к хлорамфениколу (Cm^R)	Хлорамфеникол-ацетилтрансфераза (CAT); 25 кДа
			Устойчивость к тетрациклину (Tc^R)	Белок, определяющий устойчивость к тетрациклину; 34 кДа
pLG517	10,4	18	*dacC*	Пенициллинсвязывающий белок 6 (PBP6); 40 кДа
			Tc^R	Белок, определяющий устойчивость к тетрациклину; 34 кДа
pBS42	12,2	6	*dacA*	Пенициллинсвязывающий белок 5 (PBP5); 42 кДа
			Устойчивость к канамицину (Km^R)	Канамицинфосфотрансфераза I (Kan); 27 кДа

[1] Карты плазмид приведены на рис. 1.

Таблица 3. Состав сред и буферных растворов

Агар Луриа (L-агар)[1]
1%-ный триптон (фирмы Oxoid)
0,5%-ный дрожжевой экстракт (Oxoid)
0,5%-ный NaCl
1,5%-ный агар (Oxoid № 3)
Доведите pH до 7,4

Минимальная среда М9 [6]
40 мМ Na_2HPO_4
20 мМ KH_2PO_4
8 мМ NaCl
20 мМ NH_4Cl
1 мМ $CaCl_2$
10 мМ $MgSO_4$
Проавтоклавируйте растворы $CaCl_2$ и $MgSO_4$ отдельно от других компонентов и смешайте, когда они остынут. Храните при комнатной температуре.

Питательный бульон
Приготовьте 2,5%-ный водный раствор сухой питательной среды (Oxoid № 2). Проавтоклавируйте его при 1 атм 15 мин и храните при комнатной температуре.

Питательный агар
Добавьте в питательный бульон агар (Oxoid № 3) до концентрации 1,5%.

«Триптиказный» агар[2]
1%-ный «триптиказный» пептон
0,5%-ный NaCl
1,5%-ный агар (Oxoid № 3)

Бактериальный буфер
50 мМ Na_2HPO_4
20 мМ KH_2PO_4
70 мМ NaCl
0,4 мМ $MgSO_4$
Проавтоклавируйте и храните при комнатной температуре.

Лямбда-буфер
10 мМ $MgSO_4$
0,05%-ная (вес/объем) желатина
6 мМ трис-HCl, pH 7,2
Проавтоклавируйте и храните при комнатной температуре.

Буфер для нанесения на гель для электрофореза с ДСН
0,125 М трис-HCl, pH 6,8
20%-ный глицерол
2%-ный ДСН
5%-ный 2-меркаптоэтанол
0,001%-ный (вес/объем) бромфеноловый синий
Храните при комнатной температуре.

Буфер СТЭТ
8%-ная (вес/объем) сахароза
5%-ный тритон X-100
50 мМ ЭДТА
50 мМ трис-HCl, pH 8,0
Проавтоклавируйте и храните при 4 °С.

[1] Мягкий агар Луриа содержит 0,7% агара.
[2] Мягкий «триптиказный» агар содержит 0,7% агара.

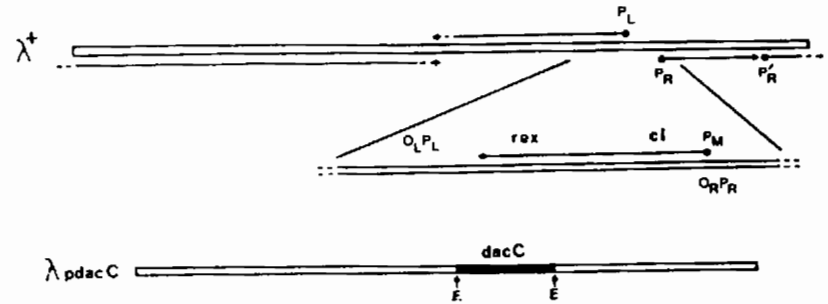


Рис. 2. Карты бактериофагов, рассмотренных в настоящей главе в качестве примеров. *А.* Бактериофаг λ^+; указаны промоторы P_L и P_R и направление транскрипции с них во время инфекции. В лизогенных штаммах эти промоторы подавлены продуктом гена *cI*, который транскрибируется вместе с геном *rex* (его функция неизвестна) с промотора P_M. Более подробно биологические свойства фага λ описаны в работе [3]. *Б.* Бактериофаг λ*pdacC* — вектор для клонирования на основе фага λ, содержащий *Eco*RI-фрагмент *dacC*, кодирующий пенициллинсвязывающий белок 6 *E. coli* (PBP6).

ду при последующей инкубации позволяет избирательно пометить белки, кодируемые плазмидой. Эту систему обычно называют макси-клетками в отличие от описанных выше мини-клеток.

Каждая из трех систем имеет свои преимущества и недостатки. Выбор той или иной системы экспрессии генов in vivo зависит прежде всего от вектора, использованного для клонирования, и от самого клонированного гена. Сравнительная оценка этих систем приведена в табл. 1. Кроме того, в таблицу включены для сравнения характеристики системы экспрессии in vitro, разработанной Зьюби и описанной в гл. 7. Свойства плазмид, рассмотренных в качестве примеров в настоящей главе, приведены в табл. 2 и на рис. 1, а карты бактериофагов — на рис. 2. Состав общих для всех трех систем сред и буферных растворов указан в табл. 3.

2. Система клеток-хозяев, облученных УФ-светом

2.1. Введение

В системе клеток-хозяев, облученных УФ-светом, транскрипция бактериальной хромосомы подавляется большой дозой УФ-облучения [1, 2]. При последующем заражении фагом λ лишь фаговая ДНК может служить матрицей для транскрипции. Добавление [^{35}S]-метионина позволяет специфически пометить кодируемые фагом белки. Биология фага λ и его использование в качестве вектора для клонирования рассмотрены в сравнительно недавно опубликованном обзоре [3].

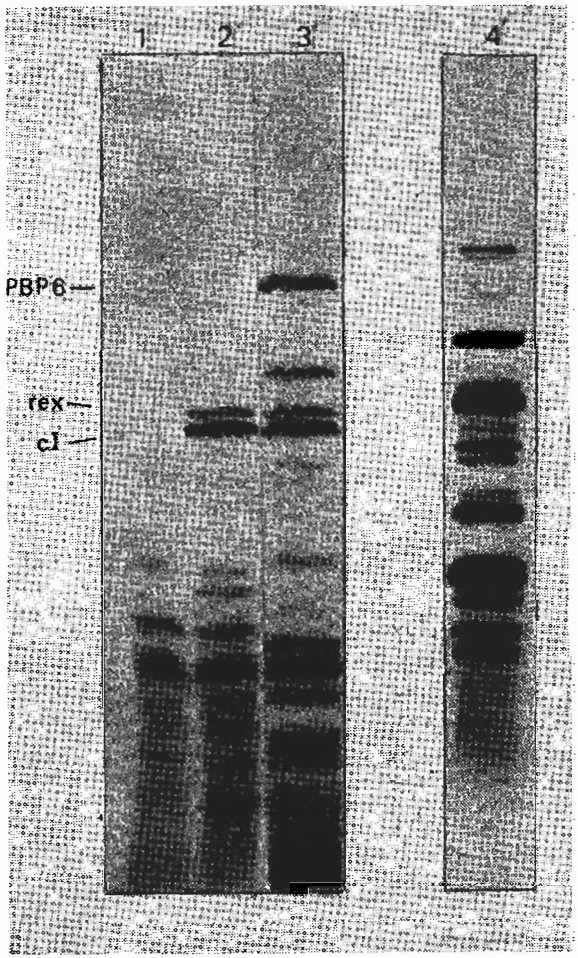


Рис. 3. Анализ кодируемых фагом белков, синтезированных в УФ-облученных клетках. Фагоспецифичные белки были помечены, как описано в табл. 8. Образцы анализировали в 15%-ном ПААГ в присутствии ДСН и флюорографировали. Дорожки *1*, *2* и *3* (хозяйский штамм *E. coli* 159λ*ind*) экспонировали 3 сут, а дорожку *4* (хозяйский штамм *E. coli* 159) — 2 ч. *1* — контроль; *2* — λ+; *3* — λ*pdacC*; *4* — λ+. Дорожка *4* демонстрирует спектр белков, кодируемых фагом λ и синтезируемых в нелизогенном хозяине; в то же время в лизогенном по фагу хозяине синтезируются только два основных белка — продукты генов *rex* и *c*I, расположенных в области иммунности фага λ. Из электрофореграммы *3* видно, что синтезируется дополнительный белок PBP6, кодируемый λ*pdacC* (см. табл. 2).

Если бактериальный штамм, используемый для облучения, лизогенен по фагу λ, то клетки будут содержать белок-репрессор (продукт гена *c*I). Он свяжется с любой суперинфицирующей фаговой ДНК и полностью подавит транскрипцию с основных промоторов P_L и P_R. В этих условиях должна транскрибироваться только область иммунности, кодирующая продукты генов *c*I и *rex* и имеющая собственный промотор ([3]; см. также рис. 3). Будут транскрибироваться также любые бактериальные гены, клонированные вместе со своими промоторами в составе суперинфицирующего фага. Это позволит избирательно пометить продукты клонированных генов. Очевидно, этот подход не годится для генов, клонированных в фаговом векторе без бактериальных промоторов или если бактериальные гены имеют очень слабые промоторы, поскольку в этом случае их экспрессия зависит от транскрипции с сильных фаговых промоторов P_L или P_R.

Хотя в настоящей главе мы обсудим только заражение *E. coli* фагом λ, подобные системы использовались для идентификации белков, кодируемых специализированными трансдуцирующими фагами P22 *Salmonella typhimurium* [4] и φ29 *Bacillus subtilis* [5].

2.2. Материалы и штаммы

Материалы и штаммы, используемые для системы клеток-хозяев, облученных УФ-светом, перечислены в табл. 4.

Таблица 4. Штаммы и растворы, необходимые для приготовления системы УФ-облученных хозяйских клеток

Штаммы бактерий[1]
E. coli 159 *uvrA*
или *E. coli* 159 *uvrA* (λ *ind*)
Бактериофаги
Например, λ^+ (титр 10^{10} БОЕ/мл)
Растворы
Среда М9 с мальтозой (раствор мальтозы автоклавируют отдельно и добавляют в минимальную среду М9[2] в качестве источника углерода)
Среда М9 с мальтозой, содержащая 20 мМ $MgCl_2$
Лямбда-буфер[2]
[^{35}S]-метионин (10 мкКи/мкл; 1000 Ки/ммоль; Amersham International)
L-метионин (8 мг/мл)
Бактериальный буфер[2]
Буфер для нанесения на гель для электрофореза с ДСН[2]

[1] Подробнее о выборе штамма бактерий-хозяев см. в разд. 2.3.
[2] Приготовление описано в табл. 3.

2.3. Штамм бактерий-хозяев

В качестве штамма-хозяина обычно используют *E. coli* 159 (*uvr A gal rps L*) [1]. Мутация *uvr A* инактивирует один из важнейших путей репарации ДНК в клетках и делает их осо-

Таблица 5. Получение фага[1]

1. Вырастите ночную культуру штамма бактерии-хозяина в питательном бульоне, содержащем 10 мМ $MgCl_2$.
2. Подготовьте серийные разведения фага в конечном объеме фагового буфера 100 мкл. Добавьте к каждому разведению 50 мкл культуры бактерий и оставьте на 10 мин при комнатной температуре, чтобы произошла адсорбция фага.
3. Добавьте к каждому разведению 3 мл расплавленного мягкого агара Луриа[2], который перед этим стоял при температуре 50 °С. Быстро перемешайте смесь и налейте ее поверх свежеприготовленного агара Луриа[1] в чашках.
4. Проинкубируйте чашки при 37 °С в течение ночи. Если фаг несет мутацию *c*I 857, проинкубируйте чашки вначале 20 мин при 42 °С, а потом в течение ночи при 37 °С.
5. Выберите чашку с таким разведеннем фага, чтобы бляшки почти слнвались. Налейте на поверхность 3 мл фагового буфера и оставьте на 30 мин при комнатной температуре.
6. Отберите буфер (теперь уже содержащий фаг) пипеткой в колбу Мак-Картни. Удалите дебрис центрифугированием в течение 10 мин при 3000 *g* (например, в роторе Sorvall SS34 при 5000 об/мин). Добавьте несколько капель хлороформа, чтобы убить оставшиеся бактерии, и храните суспензию фага при 4 °С[3].
7. Оттитруйте суспензию фага, как описано в табл. 6.

[1] Составы сред и буферных растворов даны в табл. 3.

[2] Некоторые производные фага λ, особенно если они содержат чужеродные фрагменты ДНК, растут не так хорошо, как фаг дикого типа. Поэтому они дают на богатой среде бляшки гораздо меньшего размера. В этом случае лучшие результаты получаются на более бедных средах, например на «триптиказном» агаре (табл. 3).

[3] Чтобы получить бо́льшие количества фага, нужно использовать больше чашек. Фаг должен быть разведен так, чтобы образовались практически сливающиеся бляшки.

Таблица 6. Титрование фага[1]

1. Вырастите ночную культуру штамма бактерии-хозяина в питательном бульоне, содержащем 10 мМ $MgCl_2$.
2. Приготовьте серийные разведения (в конечном объеме 100 мкл) фага в лямбда-буфере. Добавьте к каждому разведению 50 мкл культуры бактерий и оставьте на 20 мин при комнатной температуре для адсорбции фага.
3. Добавьте к каждому разведению 3 мл расплавленного мягкого L-агара, охлажденного до 50 °С. Быстро перемешайте смесь и вылейте ее на свежеприготовленные чашки с L-агаром[2].
4. Проинкубируйте чашки в течение ночи при 37 °С.
5. Подсчитайте число бляшек в каждом разведении и вычислите титр фага в БОЕ/мл.

[1] Составы сред и буферных растворов даны в табл. 3.

[2] Как указано во второй сноске к табл. 5, для фагов, которые плохо растут, иногда лучше подходит менее богатая среда, например «триптиказный» агар (табл. 3).

бенно чувствительными к УФ-облучению. Этот штамм заражается фагом λ, прототрофен и не содержит супрессорных мутаций в тРНК. Обычно используют лизогенное производное *E. coli* 159 (λ *ind*). В норме облучение УФ-светом индуцирует вырезание интегрированного фага (профага), но фаг λ *ind* не-

Таблица 7. Концентрирование препаратов фага

Фаги легко сконцентрировать осаждением в ПЭГ или центрифугированием в градиенте CsCl.

Осаждение в ПЭГ

1. Добавьте к суспензии фага примерно $^2/_3$ объема 25%-ного (вес/объем) ПЭГ-6000, 1,25 М NaCl.
2. Проинкубируйте не менее 1 ч при 4 °С; можно оставить смесь и на ночь.
3. Отцентрифугируйте 10 мин при 3600*g* при 4 °С (например, при 5000 об/мин в роторе Sorvall GS3).
4. Отбросьте супернатант и удалите избыток влаги с осадка.
5. Ресуспендируйте осадок фага в 1—2 мл фагового буфера[1].

Центрифугирование в CsCl: метод ступенчатого градиента

1. Приготовьте растворы CsCl с плотностью 1,7; 1,5 и 1,3 г/мл (коэффициент преломления 1,3952; 1,3800 и 1,3687 соответственно), смешав насыщенный раствор CsCl с фаговым буфером.
2. Налейте 5 мл раствора с наибольшей плотностью (1,7 г/мл) в прозрачную центрифужную пробирку (2,5×8,75 см). Сверху осторожно наслоите 5 мл раствора с плотностью 1,5 г/мл и затем 5 мл раствора с плотностью 1,3 г/мл. Сверху наслоите суспензию фага.
3. Отцентрифугируйте 2—6 ч при 60 000*g* при 15 °С (например, в роторе Beckman SW27 при 22 000 об/мин).
4. Фаговые частицы образуют отчетливую белую полоску в середине слоя с плотностью 1,5 г/мл. Ее видно лучше всего, если освещать ультрацентрифужную пробирку сверху. Локализовав полоску, нанесите на боковую поверхность пробирки немного вакуумной смазки и проткните пробирку через смазку шприцем. Отберите фаг с помощью этого шприца и перенесите препарат в стеклянную колбу Мак-Картни.
5. Добавьте несколько капель хлороформа и храните препарат при 4 °С. В растворе CsCl фаговые частицы вполне стабильны. Если же это необходимо, CsCl можно удалить диализом против фагового буфера.

Градиентное центрифугирование в CsCl: метод самообразующегося градиента

1. Доведите плотность суспензии фага до 1,5 г/мл (коэффициент преломления 1,3800) с помощью насыщенного раствора CsCl.
2. Перенесите смесь в прозрачную ультрацентрифужную пробирку (например, 1,5×7,5 см). Если нужно, заполните оставшуюся часть пробирки раствором CsCl в фаговом буфере с той же плотностью. Тщательно перемешайте.
3. Отцентрифугируйте 40 ч при 100 000*g* при 15 °С (например, в роторе Beckman 50 Ti при 35 000 об/мин).
4. Отберите фаг и проведите операции, описанные в пп. 4 и 5 метода ступенчатого градиента.

[1] Состав фагового буфера (лямбда-буфера) дан в табл. 3.

сет мутацию, подавляющую эту индукцию. Впрочем, для облучения используют такую большую дозу, что это, по-видимому, излишняя предосторожность, поскольку сам профаг сильно повреждается УФ-светом.

2.4. Получение фага

Методы получения и титрования фага описаны в табл. 5 и 6; их также легко найти в литературе [6, 7]. В идеале суспензия фага должна иметь титр не менее 10^{10} БОЕ/мл, чтобы

клетки можно было заражать с высокой множественностью (5—10 БОЕ на клетку; см. разд. 2.5, п. 4). Если необходимо, препарат фага можно сконцентрировать осаждением в ПЭГ и/или центрифугированием в градиенте плотности CsCl (табл. 7 и работы [6—8]). Перед использованием препарат фага следует хорошо диализовать, чтобы удалить эндогенный метионин, иначе включение метки может оказаться низким. Суспензии фагов хранят обычно в стеклянной посуде, промытой хромовой смесью или концентрированной серной кислотой для удаления следов детергентов, к которым фаги весьма чувствительны. К суспензиям всегда добавляют несколько капель хлороформа, чтобы убить любые бактериальные примеси. Перед использованием суспензии следует удалить хлорофором, пробулькивая через суспензию фага стерильный воздух или азот.

2.5. Методика введения метки в кодируемые фагом белки

Все стадии получения системы клеток-хозяев, облученных УФ-светом, перечислены в табл. 8. Однако некоторые детали методики следует обсудить более подробно.

1. Использование для выращивания клеток-хозяев минимальной среды М9, содержащей мальтозу в качестве единственного источника углерода, имеет веские причины. Фаг λ может инфицировать клетки *E. coli* только в том случае, если на поверхности клетки присутствует продукт гена *lam B*. Этот белок участвует в транспорте мальтозы и служит в то же время рецептором фага. В норме он содержится в количестве всего нескольких молекул на клетку, но ген *lam B* можно индуцировать, выращивая бактерии на мальтозе: при этом образуется гораздо больше рецепторного белка. Таким образом, индукцию гена *lam B* можно использовать для увеличения эффективности заражения фагом. В среду не добавляют глюкозу, поскольку это вызывает катаболитную репрессию мальтозного оперона.

2. Штаммы *E. coli* 159 и 159 (λ *ind*) медленно растут на минимальной среде М9, содержащей мальтозу: время удвоения составляет около 120 мин. При желании можно добавить в среду глицерол до конечной концентрации 0,4% (по объему); это снижает время удвоения до 90 мин. Если A_{450} культуры после инкубации при 37 °С больше или меньше указанной величины 0,64 (табл. 8, п. 2), но клетки продолжают расти экспоненциально, культуру можно развести или сконцентрировать (с помощью центрифугирования) до нужной плотности. Важно точно знать число клеток, взятых в эксперимент, чтобы провести заражение с нужной множественностью.

3. После облучения (табл. 8, п. 3) клетки концентрируют в пять раз в среде, содержащей 20 мМ $MgCl_2$ (пп. 4 и 5).

Таблица 8. Мечение кодируемых фагом белков в системе УФ-облученных клеток-хозяев[1]

1. Растите хозяйский штамм в среде М9 с мальтозой при 37 °С в течение ночи.
2. Разведите культуру до $A_{450}=0{,}1$ и растите при 37 °С до $A_{450}=0{,}64$ ($\sim 2\cdot 10^8$ клетка/мл). В этих условиях время удвоения *E. coli* 159 составляет примерно 120 мин[2].
3. Перенесите 10 мл этой культуры в чашку Петри диаметром 9 см. Толщина слоя жидкости не должна превышать ~0,3 см. Облучите чашку УФ-светом с длиной волны 254 нм (доза 1200 Дж/м^2), покачивая чашку, чтобы все клетки были облучены.
4. Для каждой пробы поместите 500 мкл культуры в микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл. Осадите клетки (2 мин в микроцентрифуге) и отбросьте супернатант.
5. Ресуспендируйте клетки в 100 мкл предварительно подогретой среды М9 с мальтозой, содержащей 20 мМ $MgCl_2$. Добавьте фаг λ в 10—100 мкл фагового буфера; множественность заражения должна составлять 5—10 БОЕ на клетку. В контрольную пробу добавьте эквивалентный объем фагового буфера без фага.
6. Проинкубируйте 10 мин при 37 °С.
7. Добавьте 400 мкл предварительно подогретой среды М9 с мальтозой и проинкубируйте еще 20 мин при 37 °С.
8. Добавьте 10—100 мкКи [^{35}S]-метионина (10 мкКи/мкл; 1000 Ки/ммоль) и проинкубируйте 10 мин при 37 °С.
9. Добавьте 200 мкл немеченого L-метионина (8 мг/мл) и проинкубируйте 5 мин при 37 °С.
10. Охладите образцы во льду 2 мин. Осадите клетки (микроцентрифуга, 2 мин) и отбросьте супернатант.
11. Суспендируйте осадок клеток в бактериальном буфере и снова отцентрифугируйте клетки. Отбросьте супернатант.
12. Ресуспендируйте клетки в 25 мкл бактериального буфера и добавьте 25 мкл буфера с ДСН для нанесения на гель для проведения электрофореза. Проинкубируйте 3 мин в кипящей водяной бане.
13. Нанесите по 25 мкл из каждой пробы на пластинку геля ПААГ — ДСН[3]. Остаток храните при —20 °С.
14. После электрофореза проведите флюорографию геля, чтобы выявить меченые белки[3].

[1] Состав сред и буферных растворов указан в табл. 3, подробное описание штаммов бактерий-хозяев и фагов приведено в табл. 4.

[2] Можно добавить в среду глицерол до концентрации 0,4%, это снижает время удвоения до 90 мин.

[3] Описание подходящих методик электрофореза и флюорографии можно найти в работе [10].

Присутствие некоторого количества ионов магния необходимо как для обеспечения стабильности фаговых частиц, так и для адсорбции фага, но такая высокая концентрация магния, кроме того, предотвращает подавление белкового синтеза, которое наблюдается при заражении клеток фагом с высокой множественностью [1].

4. Обычно оптимальной является множественность заражения 5—10; если она ниже 5, меченый метионин включается слабо, если она слишком высока, то при заражении лизогенного штамма есть риск оттитровать весь репрессор, что приведет к экс-

прессии фаговых генов. Если в качестве хозяина используют лизоген по фагу λ, то критерием правильно подобранной множественности заражения служит экспрессия только двух фаговых белков — продуктов генов *cI* и *rex* при заражении фагом λ дикого типа (λ^+) (см. рис. 3, *Б*).

5. Незараженные хозяйские клетки также следует проинкубировать с [^{35}S]-метионином, чтобы проверить остаточный уровень экспрессии бактериальных хромосомных генов. Для такой контрольной инкубации в смесь добавляют эквивалентное количество лямбда-буфера вместо суспензии фага (табл. 8, п. 5).

6. После добавления фага образцы инкубируют 10 мин при 37 °С, чтобы фаг адсорбировался (табл. 8, п. 6). Затем образцы разводят, добавляют [^{35}S]-метионин и инкубируют еще 10 мин, чтобы пометить кодируемые фагом белки. После этого клетки инкубируют непродолжительное время с немеченым метионином, чтобы синтез меченых белков дошел до конца.

7. Клетки один раз промывают буфером, затем ресуспендируют в небольшом объеме буфера и подготавливают к анализу в ПААГ—ДСН. Поскольку эффективность включения метки обычно довольно низка, после электрофореза приходится проводить флюорографию геля, чтобы выявить меченые белковые продукты. Электрофорез в ПААГ—ДСН и флюорография были подробно описаны в вышедшем раньше томе настоящей серии [10].

На рис. 3 приведены примеры мечения белков, кодируемых фагом, после заражения клеток, облученных УФ-светом.

2.6. Возможные проблемы

2.6.1. Высокий фон

Высокое фоновое включение [^{35}S]-метионина в контроле (без добавления фага) указывает, что доза УФ-облучения (табл. 8, п. 3) слишком мала. При использовании системы с заражением фагом повышение дозы УФ-облучения снижает фон, но это сопровождается общим снижением белкового синтеза [11]. Приемлемый уровень фона зависит от эффективности экспрессии исследуемых генов, так что оптимальную дозу облучения, возможно, придется определять эмпирически. Обычно применяют дозы от 400 до 1200 Дж/м^2. Для получения воспроизводимых результатов рекомендуется использовать дозиметр.

2.6.2. Низкое включение

Эффективность включения [^{35}S]-метионина часто оказывается существенно ниже, чем при использовании систем мини- и макси-клеток, особенно если в качестве хозяина берут лизо-

геный штамм. Для повышения эффективности включения необходимо помнить следующее:

1. Фаголизат должен иметь достаточно высокий титр (10^{10} БОЕ/мл) и должен быть как следует диализован против лямбда-буфера (табл. 3) перед употреблением.

2. Удельная радиоактивность [^{35}S]-метионина должна быть максимальной (>1000 Ки/ммоль).

3. Доза УФ-облучения должна быть минимальной, обеспечивающей приемлемый уровень фонового включения (разд. 2.6.1).

4. Флюорография ПААГ после электрофореза для выявления меченых продуктов должна проводиться в условиях максимальной чувствительности. Может оказаться полезной предварительная кратковременная засветка рентгеновской пленки для повышения ее чувствительности [10, 12].

2.7. Использование нелизогенного хозяина

Белки, которые кодируются трансдуцирующими фагами λ, можно обнаружить и при заражении нелизогенных клеток *E. coli*, облученных УФ-светом. В этом случае из-за отсутствия репрессора в клетках происходит транскрипция фаговых генов и клонированных генов с промоторов P_L и P_R. Это может оказаться полезным, если хромосомные гены имеют очень слабые промоторы или были отделены от своих собственных промоторов.

2.8. Использование фагов с другими областями иммунности

2.8.1. Репрессия областей иммунности фагов 434 и 21

Хотя выше речь шла только о фагах, содержащих область иммунности λ, многие векторы, использующиеся для клонирования, имеют области иммунности фагов 434 или 21. Чтобы репрессировать основные транскрипционные единицы этих фагов, следует использовать в качестве штаммов-хозяев *E. coli* 159 (λ *imm* 434) или 159 (λ *imm* 21) соответственно. Однако эти профаги не подавляют суперинфицирующие фаги столь же эффективно, как профаг *imm* λ. Поэтому, работая с фагами, имеющими область иммунности 434, авторы используют в качестве штамма-хозяина *E. coli* 159, несущую плазмиду pGY101. Плазмида pGY101 содержит ген репрессора фага 434 и продуцирует примерно в 70 раз больше респрессорного белка, чем профаг λ *imm* 434 [13]. Была также сконструирована плазмида с геном репрессора фага 21 [14]. Она может быть использована для фагов *imm*21. Альтернативный метод подавления экспрессии

генов фага *imm*21 состоит в сокращении до минимума продолжительности всех инкубаций [15]: дело в том, что число фагов, преодолевающих иммунологический барьер при заражении, по-видимому, существенно возрастает при увеличении времени инкубации.

2.8.2. Фаги с гибридным иммунитетом

Более совершенный вариант описываемого метода — использование фагов с гибридным иммунитетом [16] для определения направления транскрипции клонированных генов. Такие фаги были сконструированы, например, из левой половины области λ *imm* и правой половины области *imm* 434, что позволяет независимо регулировать промоторы P_L и P_R. Кроме того, внесение амбер-мутации в ген *N* дает возможность регулировать транскрипцию с P_L с помощью супрессирующих и несупрессирующих клеток-хозяев. Экспрессию генов, клонированных так, чтобы они транскрибировались под контролем P_L, можно изучать обычным методом заражения облученных хозяйских клеток. Благодаря антитерминирующим свойствам белка *N* транскрипция в супрессирующем хозяине пройдет через все клонированные гены, если только в их составе нет очень сильного терминатора. Поскольку экспрессия этих генов будет увеличиваться или уменьшаться под действием мощной транскрипции фага λ [17], сравнение экспрессии клонированных генов в супрессирующих и несупрессирующих клетках-хозяевах позволяет определить направление транскрипции каждого гена. Хотя с такими фагами часто трудно работать, этот подход был с успехом использован в ряде исследований [15, 18, 19].

3. Система мини-клеток

3.1. Введение

Клетки *E. coli*, несущие две мутации, *min A* и *min B*, делятся асимметрично, так что примерно каждое второе деление приводит к образованию небольшой «безъядерной» клетки [20]. Эти мини-клетки, способные синтезировать ДНК, РНК и белок, можно отделить от более крупных жизнеспособных клеток дифференциальным центрифугированием в градиентах сахарозы. Если штамм, продуцирующий мини-клетки, содержит небольшие многокопийные плазмиды, большинство мини-клеток будут содержать по законам теории вероятности хотя бы одну молекулу плазмиды и не будут содержать бактериальную хромосому. Такие мини-клетки синтезируют кодируемые плазмидой белки в течение длительного времени практически в тех же

условиях, что и внутри бактериальной клетки. В обзоре [21] подробно рассмотрены свойства мини-клеток, а также мутантов, продуцирующих мини-клетки, полученных из различных видов бактерий.

3.2. Материалы и штаммы

Материалы и штаммы, используемые для системы мини-клеток, перечислены в табл. 9.

Таблица 9. Бактериальный штамм и растворы, необходимые для приготовления системы мини-клеток

Бактериальный штамм
E. coli DS410 (разд. 3.3), содержащий необходимые плазмиды
Растворы
Питательный бульон[1]
Антибиотики для селекции плазмидных маркеров
Минимальная среда М9
Минимальная среда М9, содержащая 20% (вес/объем) сахарозы
Минимальная среда М9, содержащая 30% (по объему) глицерола
10,5%-ная среда для включения метионина (вес/объем) (фирмы Difco)
[^{35}S]-метионин (10 мкКи/мкл; 1000 Ки/ммоль)
L-метионин (8 мг/мл)
Бактериальный буфер[1]
Буфер для нанесения на гель для проведения электрофореза с ДСН[1]

[1] Составы сред и буферных растворов даны в табл. 3.

3.3. Штамм *Escherichia coli* DS410 — продуцент мини-клеток

Первоначально был выделен штамм — продуцент мини-клеток *E. coli* P678-54 (его также обозначают χ 925) [20] с генотипом F$^-$ *min A min B thr leu thi ara lac Y gal mal A xyl mtl ton A rps L sup E*. Впоследствии Дуган и Шеррат [22] выделили его производное DS 410 с генотипом *thr*$^+$ *leu*$^+$ *mal*$^+$ *lac*$^+$ *sup*^{0}, которое в настоящее время широко используется для получения мини-клеток.

3.4. Подходящие плазмиды

Все изученные плазмиды, по-видимому, попадают в мини-клетки. Малокопийные плазмиды, например pSC101, сегрегируют с высокой эффективностью [23]. В мини-клетках обнаруживаются даже такие крупные конъюгативные плазмиды, как F-фактор, хотя в подобных случаях сегрегация не всегда происходит достаточно эффективно [21]. Выделение плазмид и трансформацию хозяина — продуцента мини-клеток проводят так, как описано в табл. 10 и 11 соответственно.

Прежде чем производить очистку мини-клеток, следует приготовить непрерывные градиенты сахарозы 10—30% (вес/объ-

Таблица 10. Выделение плазмидной ДНК[1, 2]

1. Вырастите ночную культуру штамма бактерий, содержащего плазмиду, в питательном бульоне.
2. Перенесите 1,5 мл культуры в микроцентрифужную пробирку и осадите клетки центрифугированием в течение 1 мин.
3. Отбросьте супернатант и ресуспендируйте осадок в 75 мкл буфера СТЭТ.
4. Добавьте 6 мкл раствора лизоцима (10 мг/мл) и быстро перемешайте.
5. Поместите пробирку в кипящую водяную баню на 1 мин.
6. Отцентрифугируйте на микроцентрифуге 10 мин, чтобы осадить комплекс хромосомной ДНК с белками.
7. Перенесите супернатант в чистую пробирку и добавьте равный объем изопропанола. Оставьте на 10 мин при —70 °С или на 1 ч при —20 °С, чтобы осадить нуклеиновые кислоты.
8. Отцентрифугируйте 10 мин в микроцентрифуге, чтобы осадить нуклеиновые кислоты.
9. Отбросьте супернатант и ресуспендируйте осадок в 100 мкл 0,3 М ацетата натрия, pH 5,6. Добавьте 0,3 мл абсолютного этанола, а затем осадите нуклеиновые кислоты, как описано в пп. 7 и 8.
10. Отбросьте супернатант и высушите осадок под вакуумом.
11. Ресуспендируйте осадок в 30 мкл 10 мМ трис-HCl, pH 7,5, 1 мМ ЭДТА.
12. Храните при 4 °С до использования; 10 мкл этого препарата должно хватить для эффективной трансформации (см. табл. 11).

[1] Методы выделения небольших количеств плазмид вполне подходят для последующей трансформации. Приведенная пропись основана на методе Холмса и Квигли [24], но можно использовать другие методы (см., например, работу [25] или гл. 7, табл. 8).
[2] Составы сред и буферных растворов даны в табл. 3.

3.5. Получение мини-клеток

ем). Их можно готовить обычным образом, с помощью градиентных сосудов. Альтернативный простой метод формирования градиентов — замораживание и оттаивание (табл. 12). Эта процедура позволяет получать вполне пригодные, воспроизводимые сахарозные градиенты и дает возможность в один прием подготовить большое их число. Затем проводят очистку мини-клеток, как это описано в табл. 13. Некоторые из представленных там операций следует обсудить подробнее.

1. Бактерии выращивают на богатой среде до стационарной фазы обычно в течение ночи. Мини-клетки продолжают образовываться в стационарной фазе в течение нескольких часов [21].

2. Первое низкоскоростное центрифугирование (табл. 13, п. 3) позволяет удалить часть нормальных (содержащих нуклеоид) клеток и предотвращает перегрузку сахарозных градиентов.

3. Получение мини-клеток включает два последовательных центрифугирования в градиенте сахарозы (табл. 13, пп. 5 и 9). На рис. 4, *Б* показан профиль градиента после первого центрифугирования. Жизнеспособные клетки образуют широкую зону у дна пробирки и частично осаждаются. Зона мини-клеток вид-

Таблица 11. Приготовление компетентных клеток и их трансформация[1]

1. Вырастите ночную культуру нужного штамма бактерий в питательном бульоне при 37 °С.
2. Разведите культуру свежим питательным бульоном в 50 раз и растите до $A_{600}=0{,}2$. Охладите во льду.
3. Перенесите 30 мл культуры в центрифужную пробирку и осадите клетки центрифугированием в течение 10 мин при 3000g при 4 °С (например, в роторе Sorvall SS34 при 5000 об/мин).
4. Отбросьте супернатант и ресуспендируйте осадок в 15 мл 0,1 М $CaCl_2$, охлажденного во льду. Оставьте во льду на 20 мин.
5. Осадите клетки, как описано в п. 3; они образуют на дне пробирки мутное кольцо с размытыми краями.
6. Отбросьте супернатант и ресуспендируйте осадок в 1 мл 0,1 М $CaCl_2$, охлажденного во льду. Храните до использования при 4 °С[2]. Теперь это «компетентные» клетки, т. е. они способны претерпевать трансформацию.
7. Перенесите 0,2 мл компетентных клеток в микроцентрифужную пробирку и добавьте 0,1 мкг плазмидной ДНК. Поставьте также контрольный опыт с компетентными клетками без ДНК. Оставьте обе пробирки во льду на 1 ч.
8. Подвергните клетки тепловому шоку, перенеся их в водяную баню с температурой 42 °С на 5 мин.
9. Разбавьте каждую пробу 2 мл питательного бульона и проинкубируйте на качалке при 37 °С в течение по меньшей мере 1 ч, чтобы признак устойчивости к антибиотику, кодируемый плазмидой, успел экспрессироваться.
10. Посейте по 100 мкл серийных разведений клеток на чашки с питательным агаром, содержащим соответствующие антибиотики, и проинкубируйте в течение ночи при 37 °С.
11. Пересколите подходящую колонию. Чтобы обеспечить генетическую гомогенность колонии, рассейте ее хотя бы один раз штрихом до отдельных колоний, прежде чем использовать для дальнейших экспериментов.

[1] Составы сред и буферных растворов приведены в табл. 13.

[2] Компетентность клеток увеличивается при 4 °С в течение примерно 24 ч [26], а затем их жизнеспособность резко падает. Компетентные клетки можно ресуспендировать в 0,1 М $CaCl_2$, 30%-ном глицероле и заморозить при —70 °С [27]. Такие замороженные клетки можно хранить в течение нескольких месяцев.

Таблица 12. Приготовление сахарозных градиентов

1. Разлейте пипеткой по 35 мл минимальной среды М9[1], содержащей 20% (вес/объем) сахарозы, в нужное число пробирок. Используйте прозрачные центрифужные пробирки, чтобы полосы были видны. Лучше всего подходят полисульфоновые пробирки объемом 50 мл.
2. Поместите пробирки в холодильник на —70 °С не менее чем на 1 ч или до полного замораживания градиентов.
3. Накануне эксперимента поместите пробирки на ночь в холодильник на 4 °С, чтобы их содержимое оттаяло.

[1] Составы сред и буферных растворов приведены в табл. 3.

на обычно над нормальными клетками, хотя эти две зоны не всегда хорошо разделяются. Следует отобрать только верхние 2/3 содержимого зоны мини-клеток (табл. 13, п. 7). Это снижает риск загрязнения жизнеспособными клетками. После

Таблица 13. Получение мини-клеток[1]

1. Вырастите 400 мл культуры *E. coli* DS410 или того же штамма, несущего плазмиду, в питательном бульоне, содержащем соответствующий антибиотик. Продолжайте инкубацию до поздней стационарной фазы роста (раздел 3.5, п. 1).
2. Охладите клетки в течение 10 мин при 4 °С
3. Отцентрифугируйте клетки 5 мин при 700*g* (например, в роторе Sorvall GS3 при 2000 об/мин) и затем перенесите супернатант в чистые центрифужные стаканы.
4. Соберите мини-клетки и оставшиеся хозяйские клетки центрифугированием в течение 15 мин при 11 000*g* при 4 °С (например, в роторе Sorvall GS3 при 8000 об/мин). Отбросьте супернатант.
5. Ресуспендируйте осадок клеток в 6 мл минимальной среды М9 и наслоите суспензию на два сахарозных градиента 10—30% (вес/объем)[2].
6. Отцентрифугируйте градиенты в бакет-роторе 18 мин при 4000*g* при 4 °С (например, в роторе Sorvall HB4 при 5000 об/мин).
7. Отберите пастеровской пипеткой верхние $^2/_3$ содержимого зоны мини-клеток (см. рис. 4, *Б*) из каждого градиента и объедините.
8. Добавьте равный объем минимальной среды М9 и соберите мини-клетки центрифугированием при 16 000*g* в течение 10 мин (например, в роторе Sorvall HB4 при 10 000 об/мин). Отбросьте супернатант.
9. Ресуспендируйте мини-клетки в 3 мл минимальной среды М9 и наслоите их на сахарозный градиент 10—30% (вес/объем).
10. Отцентрифугируйте градиент, как описано в п. 6. Отберите верхние $^2/_3$ содержимого зоны мини-клеток (см. рис. 4, *Б*) и перенесите в пробирку во льду.
11. Добавьте равный объем минимальной среды М9 и измерьте окончательный объем. Определите оптическую плотность препарата при 600 нм.
12. Перенесите мини-клетки в центрифужную пробирку и соберите их, как в п. 8.
13. Ресуспендируйте мини-клетки в минимальной среде М9, содержащей 30% (по объему) глицерола, так чтобы $A_{600}=2{,}0$ ($\sim 2\cdot 10^{10}$ мини-клетка/мл).
14. Перенесите суспензию в стерильную микроцентрифужную пробирку и храните при —70 °С. В этих условиях мини-клетки остаются стабильными по меньшей мере год.

[1] Составы сред и буферных растворов и подробное описание штаммов бактерий даны в табл. 3 и 9.
[2] Приготовление градиентов описано в табл. 12.

фракционирования мини-клеток во втором сахарозном градиенте зона мини-клеток четко отделяется от жизнеспособных клеток (рис. 4, *Б*). И в этом случае следует отбирать только верхние 2/3 зоны мини-клеток (табл. 13, п. 10).

4. Рекомендуется проверить под микроскопом степень загрязнения мини-клеток жизнеспособными клетками (табл. 13, п. 12) (см. рис. 5 и разд. 3.7), прежде чем суспендировать мини-клетки в минимальной среде, содержащей 30%-ный глицерол, для дальнейшего хранения (п. 13). Их можно хранить в таком виде не менее года без всякой потери активности (рис. 6).

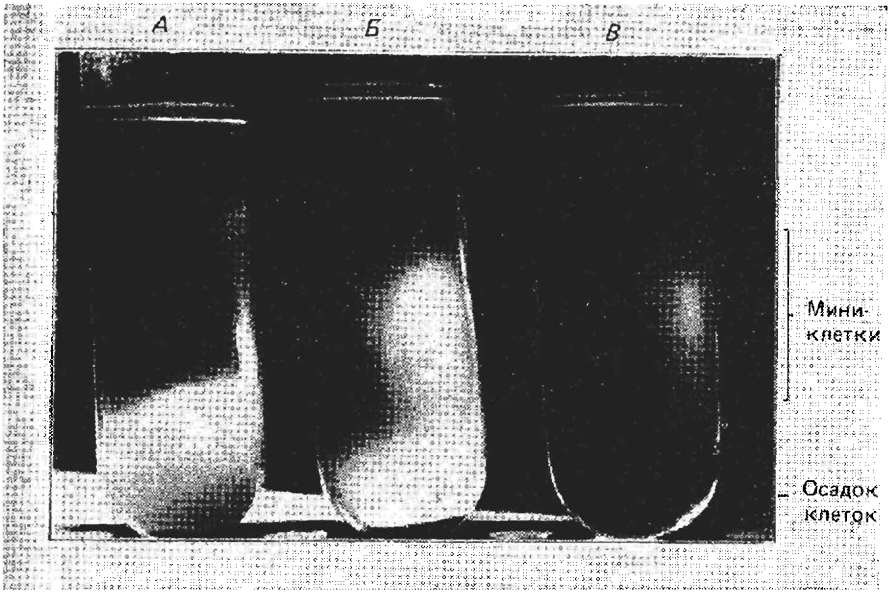


Рис. 4. Очистка мини-клеток в сахарозных градиентах (см. табл. 13). *А* — штамм, не продуцирующий мини-клеток, первый градиент; *Б* — штамм *E. coli*DS410, первый градиент (табл. 13); *В* — DS410, второй градиент (табл. 13). Кажущаяся неравномерность полос — артефакт освещения, а не метода разделения.

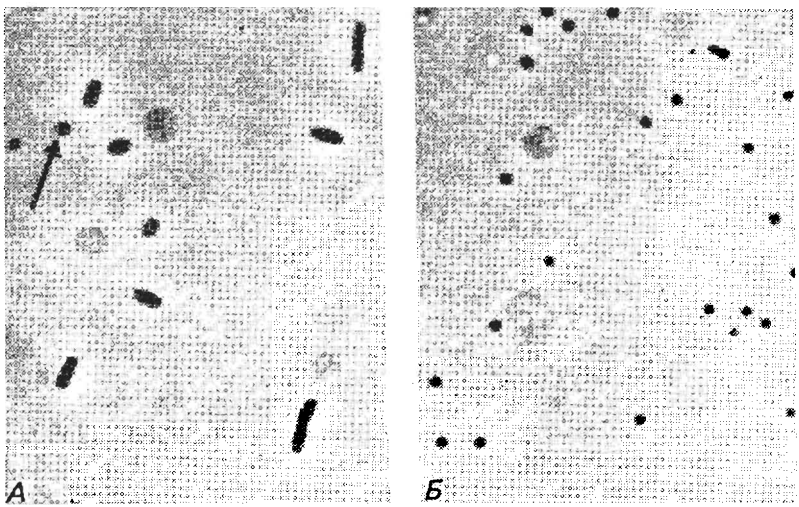


Рис. 5. Фазово-контрастная микроскопия мини-клеток. *А* — исходная культура DS410; *Б* — очищенные мини-клетки. Увеличение×1250. Мини-клетка на фото *А* отмечена стрелкой.

3.6. Мечение белков, кодируемых плазмидой

Мечение очищенных мини-клеток описано в табл. 14. Леви [28] сообщал, что мини-клетки содержат какие-то весьма стабильные мРНК с периодом полужизни 40—80 мин. Большинство этих мРНК кодируют наружные мембранные белки. Этот факт нашел подтверждение в работе [29], где было показано, что заметный уровень трансляции стабильных мРНК сохраняется вплоть до 90 мин инкубации. Поэтому рекомендуется перед добавлением [^{35}S]-метионина провести предварительную инкубацию мини-клеток в течение 60—90 мин при 37 °С. Упомянутые авторы полагают, что достаточно инкубации в течение 1 ч.

Таблица 14. Мечение кодируемых плазмидой белков в мини-клетках[1]

1. Полностью разморозьте суспензию мини-клеток[2] и перенесите 100 мкл в стерильную микроцентрифужную пробирку. Остальные мини-клетки снова заморозьте.
2. Осадите мини-клетки (3 мин в микроцентрифуге) и отбросьте супернатант. Ресуспендируйте осадок клеток в 200 мкл минимальной среды М9 и добавьте 3 мкл 10,5%-ной (вес/объем) среды для включения метионина фирмы Difco.
3. Проинкубируйте мини-клетки 90 мин при 37 °С.
4. Добавьте 25 мкКи [^{35}S]-метионина (10 мкКи/мкл; 1000 Ки/ммоль) и проинкубируйте 60 мин при 37 °С.
5. Добавьте 10 мкл раствора немеченого L-метионина (8 мг/мл) и проинкубируйте еще 5 мин.
6. Осадите мини-клетки в микроцентрифуге (3 мин) и отбросьте супернатант.
7. Ресуспендируйте мини-клетки в 50 мкл бактериального буфера и добавьте 50 мкл буфера с ДСН для нанесения на гель для электрофореза. Прогрейте 3 мин в кипящей водяной бане.
8. Нанесите 25 мкл пробы на пластинку ПААГ с ДСН[3]. Остаток храните при —20 °С.
9. После электрофореза проведите радиоавтографию или флюорографию геля для выявления меченых белков[3].

[1] Составы сред и буферных растворов даны в табл. 3.
[2] Препараты мини-клеток (приготовленные так, как это описано в табл. 13) можно оттаивать и снова замораживать много раз без заметной потери активности. Клетки можно оттаивать при 37 °С.
[3] Описание подходящих методик можно найти в работе [10].

Хотя это и не обязательно, можно ввести в инкубационную среду с [^{35}S]-метионином смесь для введения меченого метионина (фирма Difco). Это повышает эффективность включения изотопа.

Рис. 6 иллюстрирует некоторые примеры синтеза белков, кодируемых плазмидами, в мини-клетках.

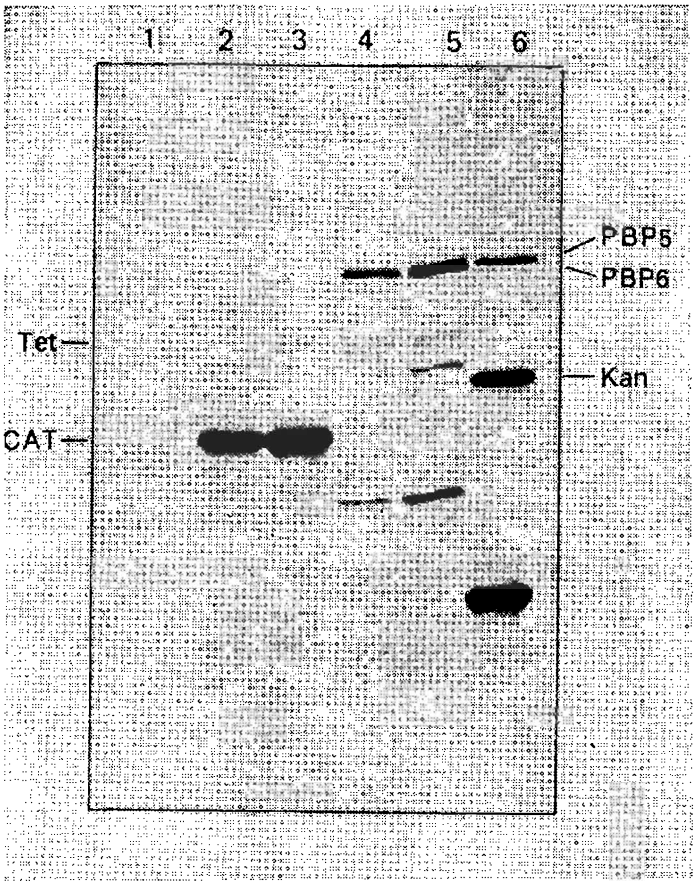


Рис. 6. Мечение кодируемых плазмидами белков в мини-клетках. После выделения мини-клетки метили [^{35}S]-метионином (табл. 13 и 14). Образцы анализировали в 15%-ном ПААГ в присутствии ДСН и проводили радиоавтографию в течение 12 ч. 1 — DS410; 2 и 3 — DS410, содержащий pACYC184; 4 и 5 — DS410, содержащий pLG517; 6 — DS410, содержащий pBS42. Препараты мини-клеток, использованные для проб 2 и 4, хранились при —70 °С в течение года, а мини-клетки проб 1 и 3 были свежеприготовленными. Белки Tet, CAT, Kan, PBP5 и PBP6 описаны в табл. 2.

3.7. Возможные проблемы

Основная проблема, с которой чаще всего сталкиваются при получении мини-клеток, — загрязнение препарата жизнеспособными клетками. Прежде чем использовать мини-клетки, следует оценить степень загрязнения одним из двух способов. Первый заключается в разведении препарата мини-клеток бактериальным буфером (A_{600}=2,0; табл. 13, п. 13) и посеве

аликвоты на питательный агар. После инкубации при 37 °С в течение ночи подсчитывают число колоний. Мини-клетки не могут расти, так как не содержат нуклеоида. Загрязнение препарата мини-клеток на уровне 10^5 жизнеспособных клеток в 1 мл и меньше можно считать приемлемым. Другой способ проверки загрязнения основан на фазово-констрастной микроскопии (рис. 5). Для этого мини-клетки ($A_{600}=2{,}0$) просматривают под микроскопом перед замораживанием (табл. 13, п. 14) При увеличении 400× наличие одной родительской клетки в поле зрения соответствует концентрации примерно 10^5 клетка/мл, что и составляет приемлемый уровень загрязнения [29]. К сожалению, описанные методы достаточно надежны только при значительном уровне загрязнения. Кроме того, приемлемый уровень загрязнения зависит от относительной силы промоторов исследуемых генов, а о нем можно судить лишь после того, как мини-клетки проинкубированы с [^{35}S]-метионином и меченые белки проанализированы с помощью электрофореза в ПААГ—ДСН и последующей радиоавтографии.

Если все-таки загрязнение клетками остается проблемой, можно добавить во время инкубации 100 мкг/мл ампициллина (натриевая соль), чтобы убить жизнеспособные клетки. Если же мини-клетки содержат плазмиду, кодирующую β-лактамазу, можно вместо ампициллина использовать D-циклосерин (100 мкг/мл).

Было показано, что если штамм *E. coli* DS410 несет мутацию *recA*, мини-клетки довольно плохо отделяются от целых клеток. Кроме того, клонирование некоторых генов, кодирующих белки оболочки *E. coli*, в составе многокопийных плазмид может нарушать деление клеток DS410 и приводить к низкому выходу очищенных мини-клеток. Поэтому при работе с плазмидами, которые надо поддерживать в *recA*-хозяине, или несущими гены, нарушающие образование мини-клеток, необходимо использовать другую систему экспрессии генов, например макси-клетки (разд. 4).

3.8. Фракционирование мини-клеток

В отличие от обычных бактериальных клеток мини-клетки довольно трудно разделять на мембранные, цитоплазматические и периплазматические фракции [21, 30]. В частности, количественное выделение мембранных фракций может оказаться невозможным, и тогда для этой цели придется воспользоваться какой-нибудь другой системой экспрессии генов.

3.9. Появление полипептидов-предшественников

Очень часто в мини-клетках обнаруживаются предшественники обычных белков (например, β-лактамазы; см. работу

[30]). Хотя это явление не мешает работе, его следует учитывать. То же самое справедливо и в отношении макси-клеток (разд. 4).

3.10. Заражение мини-клеток бактериофагами

Очищенные мини-клетки можно заразить бактериофагами и использовать их таким образом в качестве сопряженной системы транскрипции и трансляции генов, кодируемых этими фагами, как в системе хозяйских клеток, облученных УФ-светом (разд. 2). Если речь идет о фаге, экспрессию фаговых белков можно подавить путем заражения мини-клеток, несущих плазмиду, кодирующую ген фагового репрессора. Этот подход был рассмотрен в работе [29].

4. Система макси-клеток

4.1. Введение

У *E. coli* имеется несколько систем репарации ДНК, поврежденной УФ-светом и другими мутагенами [31]. Мутации в генах *recA* и *uvrA* приводят к инактивации основных систем репарации, а клетки становятся крайне чувствительны к УФ-облучению. Прямое подавление транскрипции из-за образования пиримидиновых димеров сопровождается интенсивной деградацией хромосомной ДНК внутриклеточными нуклеазами. Поэтому при последующей инкубации в таких макси-клетках синтезируется очень мало белка из-за отсутствия транскрибируемой ДНК. Однако если такие штаммы содержат мультикопийную плазмиду, многие плазмидные молекулы переживут УФ-облучение благодаря своему небольшому размеру по сравнению с хромосомной ДНК. При последующих инкубациях эти плазмидные молекулы служат матрицами для транскрипции, и при добавлении меченых аминокислот происходит избирательное мечение белков, кодируемых плазмидой.

4.2. Выбор штамма бактерий для получения макси-клеток

Для получения макси-клеток часто используют штамм *E. coli* CSR603, у которого нарушены все основные механизмы репарации повреждений ДНК, поскольку он несет мутации *recA*, *uvrA* и *phr*. Поэтому данный штамм крайне чувствителен к УФ-свету: одно-единственное УФ-индуцированное повреждение хромосомы летально для клетки. Клетки легко трансформируются небольшими плазмидами; крупные плазмиды можно

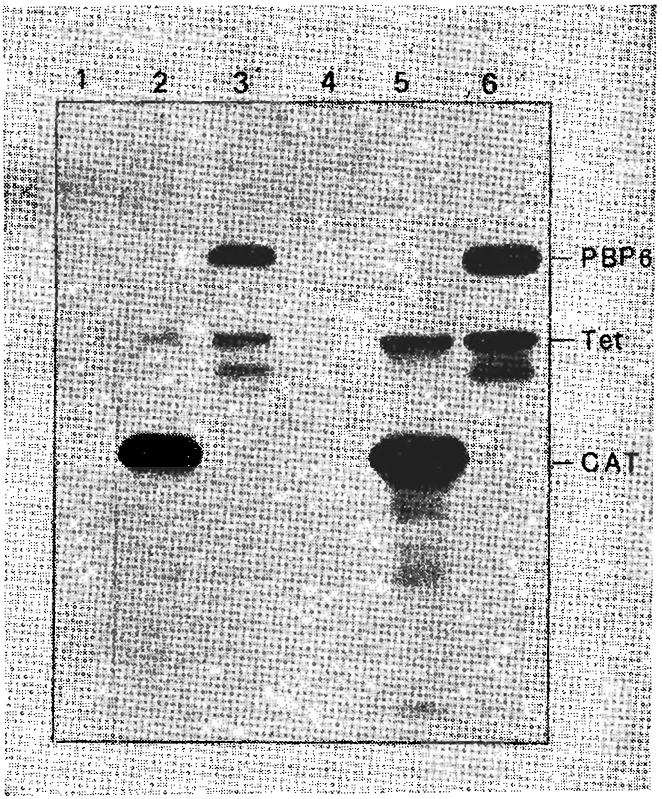


Рис. 7. Мечение кодируемых плазмидами белков в макси-клетках. Белки макси-клеток метили [^{35}S]-метионином (табл. 16). Образцы анализировали с помощью электрофореза в 15%-ном ПААГ в присутствии ДСН и проводили флюорографию в течение 24 ч. 1 — CSR603, 2 — CSR603, содержащий pACYC184; 3 — CSR603, содержащий pLG517; 4 — CSH26*recA*; 5 — CSH26*recA*, содержащий pACYC184; 6 — CSH26*recA*, содержащий pLG517. Белки Tet, CAT и PBP6 охарактеризованы более подробно в табл. 2.

ввести в них с помощью конъюгации. Однако штамм CSR603 иногда трудно поддерживать, он плохо выживает на чашках; к тому же, по нашим данным, фон включения, обусловленный остаточной транскрипцией хозяйских матриц, заметно варьирует.

В работе [32] сообщалось, что для получения макси-клеток можно использовать штаммы, несущие только мутацию *recA*. В частности, авторы исследовали штам CSH26 (Δ*recA*) в качестве альтернативы штамму CSR603. Хотя CSH26 *recA* менее чувствителен к УФ-облучению, чем CSR603, фоновую экспрессию хромосомной ДНК можно понизить до уровня экспрессии

в клетках CSR603 в оптимальных условиях (рис. 7). К тому же штамм CSH26 *recA* легче поддерживать и выращивать и он надежнее в работе, чем CSR603. Следует подчеркнуть, что для получения макси-клеток ген *recA* должен быть инактивирован. Например, штамм *recA*$^+$ *uvrA* не подходит. Это объясняется тем, что recA-белок не только участвует в рекомбинационной репарации, но также каким-то образом регулирует активность основной клеточной нуклеазы — экзонуклеазы V. Этот фермент является продуктом генов *recB* и *recC*, он отвечает практически за всю деградацию хромосомной ДНК в УФ-облученных клетках.

Во многих экспериментах по клонированию используют трансформацию какого-либо *recA*-штамма, чтобы свести к минимуму перестройки в клонируемых фрагментах ДНК. Поэтому особенно удобно, если тот же самый штамм можно использовать для получения макси-клеток: это облегчает идентификацию продуктов клонированных генов без переноса плазмиды в другого хозяина для получения макси-клеток.

4.3. Подходящие плазмиды

Система макси-клеток подобно мини-клеткам, более надежна, если используемая плазмида сравнительно невелика и представлена большим числом копий. Санкар и др. [33] обнаружили, что ColE1-подобные мультикопийные плазмиды, не поврежденные при облучении, продолжают реплицироваться, причем содержание плазмидной ДНК в клетках, в которых 80% хромосомной ДНК деградировано, за 6 ч инкубации возрастает в 10 раз. Эти авторы показали, что можно использовать тетрамер pBR322 (17,4 kb). Наконец, недавно удалось идентифицировать в макси-клетках белки, кодируемые плазмидой длиной 40 kb, представленной всего 1—2 копиями на клетку (N. Mackman, личное сообщение). Это показывает, что метод макси-клеток позволяет работать с самыми разными плазмидами.

4.4. Получение макси-клеток

Материал и штаммы, необходимые для получения макси-клеток, перечислены в табл. 15. Выделение плазмид и трансформация штамма для получения макси-клеток проводятся так же, как это описано выше для системы мини-клеток (табл. 10 и 11 соответственно). Пропись мечения белков, кодируемых плазмидой, в макси-клетках приведена в табл. 16, но некоторые моменты следует отметить особо.

1. Клетки выращивают до середины экспоненциальной фазы в минимальной среде M9 с добавлением казаминовых кис-

Таблица 15. Бактериальные штаммы и растворы, необходимые для приготовления системы макси-клеток

Бактериальные штаммы[1]
E. coli CSR603; *phr1 recA1 uvrA6 thr1 leuB6 argE3 thi1 ara14 lacY1 galK2 xyl5 mtl1 supE44 tsx33 gyrA96 rpsL31,*
или E. coli CSH26 *recA*; (*recA*)Δ (*pro lac*)Δ *thi ara rpsL*
или их производные, содержащие необходимые плазмиды
Растворы
Минимальная среда M9[2], содержащая 0,2% казаминовых кислот
Антибиотики для селекции плазмидных маркеров
Минимальная среда M9
Ампициллин (натриевая соль) (3 мг/мл)
10,5%-ная (вес/объем) смесь аминокислот для включения метионина (Difco)
[^{35}S]-метионин (10 мкКи/мкл; 1000 Ки/ммоль)
L-метионин (8 мг/мл)
Бактериальный буфер[2]
Буфер для нанесения на гель для электрофореза с ДСН[2]

[1] Подробнее о выборе штамма бактерий см. в разд. 4.2.
[2] Приготовление растворов описано в табл. 3.

лот. Используют именно эту среду, а не богатую среду типа питательного бульона, так как последняя содержит УФ-поглощающий материал, который мешает при облучении клеток (табл. 16, п. 3).

2. После облучения (п. 3) клетки инкубируют 1 ч при 37 °С, чтобы поврежденные клетки перестали расти. Все жизнеспособные растущие клетки, которые могли бы вытеснить УФ-поврежденные клетки, лизируют во время последующей инкубации в течение ночи в присутствии ампициллина (30 мкг/мл) или D-циклосерина (100 мкг/мл). Кроме того, столь продолжительная инкубация приводит к деградации поврежденной хромосомной ДНК.

3. Если используется *phr*$^+$-штамм, который способен репарировать УФ-индуцированные повреждения путем фотореактивации, сразу после облучения следует завернуть пробирки в алюминиевую фольгу и держать их закрытыми все время, пока проводятся операции, описанные в пп. 4 и 5.

4. После лизиса жизнеспособных растущих клеток оставшиеся клетки ресуспендируют в минимальной среде M9. Для того чтобы восполнить запасы аминокислот и таким образом увеличить эффективность синтеза белка, можно добавить в среду на стадии 9 смесь для включения метионина (фирмы Difco).

5. После мечения кодируемых плазмидой белков [^{35}S]-метионином клетки инкубируют в присутствии немеченого метионина для завершения синтеза полипептидов и подготавливают к электрофорезу в ПААГ с ДСН.

Таблица 16. Мечение кодируемых плазмидой белков в макси-клетках[1]

1. Вырастите ночную культуру штамма[2] для макси-клеток (предварительно трансформированного необходимой плазмидой) при 37 °С в минимальной среде, содержащей казаминовые кислоты.
2. Разведите культуру в 20 раз минимальной средой, содержащей казаминовые кислоты. Растите при 37 °С до $A_{450}=0{,}5$.
3. Перенесите 3 мл культуры в стерильную чашку Петри диаметром 5 см. Облучите УФ-светом с длиной волны 254 нм (доза 1,5 Дж/м^2), помешивая, чтобы не осталось необлученных клеток.
4. Перенесите 2 мл облученной культуры в стерильную пробирку и проинкубируйте 1 ч при 37 °С на качалке.
5. Добавьте ампициллин[3] до концентрации 30 мкг/мл и проинкубируйте культуру на качалке 16—24 ч при 37 °С.
6. Перенесите 1 мл культуры в стерильную микроцентрифужную пробирку и соберите клетки центрифугированием (2 мин на микроцентрифуге). Отбросьте супернатант.
7. Ресуспендируйте осадок клеток в минимальной среде М9 и снова соберите клетки центрифугированием, как в п. 6.
8. Повторите п. 7.
9. Ресуспендируйте клетки в 0,5 мл минимальной среды М9, содержащей 30 мкг/мл ампициллина. Добавьте 3 мкл 10,5%-ной среды (вес/объем) для включения метионина (фирмы Difco).
10. Проинкубируйте 1 ч при 37 °С.
11. Добавьте 25 мкКи [^{35}S]-метионина и проинкубируйте 1 ч при 37 °С.
12. Добавьте 10 мкл немеченого L-метионина (8 мг/мл) и проинкубируйте еще 5 мин.
13. Соберите клетки центрифугированием (микроцентрифуга, 2 мин). Отбросьте супернатант.
14. Ресуспендируйте клетки в 50 мкл бактериального буфера и добавьте 50 мкл буфера с ДСН для нанесения на гель для электрофореза. Погрейте 3 мин в кипящей водяной бане.
15. Нанесите 25 мкл пробы на пластинку ПААГ с ДСН[4]. Остаток храните при —20 °С.
16. После электрофореза проведите радиоавтографию или флюорографию геля для выявления меченых белков[4].

[1] Составы сред и буферных растворов даны в табл. 3 и 15.
[2] Подходящие штаммы описаны в табл. 15.
[3] Если плазмида кодирует β-лактамазу, следует использовать другие антибиотики (см. разд. 4.5).
[4] Подходящие методики можно найти в работе [10].

На рис. 7 представлены примеры кодируемых плазмидой белков, помеченных в макси-клетках.

4.5. Возможные проблемы

Если наблюдается заметное включение [^{35}S]-метионина в белки, не кодируемые плазмидой, возможно, придется увеличить дозу УФ-облучения, чтобы произошла более сильная деградация хромосомной ДНК. Однако на практике дозу можно варьировать в широких пределах без изменения степени деградации ДНК. Об эффективности облучения можно судить, определив число жизнеспособных клеток после посева на чашку

(оно должно быть менее 20 клеток на 1 мл в случае высокочувствительного штамма CSR603). Если взять штамм, у которого отсутствуют только *recA*-зависимые пути репарации, можно использовать дозы до 40 Дж/м^2 [32, 34]. Если облученная культура все-таки остается загрязненной растущими клетками (табл. 15), можно добавить ампициллин до концентрации 30 мкг/мл при условии, что плазмида не кодирует β-лактамазу (продукт гена *bla*). Если же плазмида несет этот ген, можно использовать D-циклосерин (100 мкг/мл). Еще один альтернативный путь состоит в добавлении β-лактамного антибиотика, относительно устойчивого к действию β-лактамазы, например цефуроксима [35] или ампициллина и клавулановой кислоты [36].

5. Соответствие между генами и их продуктами

После того как белки, кодируемые плазмидой или фагом, идентифицированы с помощью одной из систем in vivo, описанных выше, можно применить различные подходы, чтобы соотнести отдельные клонированные гены с определенными белковыми полосами.

1. Можно субклонировать небольшие фрагменты, несущие исследуемый ген, в исходной плазмиде или фаге и изучить их в системе экспрессии. Кроме того, очищенные фрагменты можно использовать в качестве матриц в системах экспрессии in vitro, описанных в гл. 7.

2. Можно клонировать мутантный аллель и сравнить его с аллелем дикого типа. Экспрессию амбер-мутанта можно исследовать в супрессирующем и несупрессирующем хозяевах; миссенс-мутация может изменить заряд белка и его подвижность при двумерном гель-электрофорезе.

3. Можно получить мутантную плазмиду с помощью транспозонов. Внедрение транспозона в исследуемый ген приведет к тому, что синтез РНК будет преждевременно терминирован или не будет идти совсем, хотя следует иметь в виду, что транспозон может оказывать полярное действие.

4. При работе с фагом λ можно вместо субклонирования фрагментов выделить ряд делетированных производных фага. Это легко сделать, если высеять фаг на агар, содержащий ЭДТА [37].

5. Наиболее четкие результаты можно получить, если сравнить нуклеотидную последовательность данного гена с аминокислотной последовательностью меченого белка. Частичное определение аминокислотной последовательности можно провести на меченом белке, вырезанном из ПААГ [38].

Если все-таки для гена, который несет плазмида или фаг, не удается найти соответствующий продукт, это можно объяснить целым рядом причин. Некоторые из них приведены ниже.

1. Интересующий нас белок не содержит метионина. В этом случае можно использовать имеющийся в продаже [^{35}S]-цистеин, хотя он и не является часто встречающейся в белках аминокислотой. Можно также использовать [^{14}C]-лейцин или смесь [^{3}H]-аминокислот с высокой удельной радиоактивностью.

2. Белок весьма нестабилен и деградирует до его идентификации с помощью электрофореза в ПААГ. Чтобы предотвратить возможную деградацию, в среду перед лизисом клеток можно добавить какой-нибудь ингибитор протеаз, например PMSF. Может помочь также весьма кратковременное мечение, например в течение 5 мин или еще быстрее; тогда постоянный синтез более стабильных белков не помешает выявлению продукта исследуемого гена. Другая возможность — система синтеза in vitro Зьюби, описанная в гл. 7, так как нестабильные в условиях in vivo пептиды в этой системе, по-видимому, более устойчивы.

3. Ген имеет слишком слабый промотор или утрачивает свой промотор при клонировании. При клонировании в фаге λ можно попробовать использовать сильный промотор P_L (разд. 2.7 и 2.8). Если ген клонирован в плазмиде, сильный промотор может быть введен с помощью стандартных методов получения рекомбинантных ДНК.

4. Белок агрегирует при электрофорезе и в результате не проникает в разделяющий гель. Это может произойти с очень гидрофобными белками. Иногда агрегации препятствует растворение белков в буфере с ДСН для нанесения образцов при 37 °С вместо 100 °С [39, 40].

Благодарности

Эта работа частично финансировалась MRC Project Grant Award № G8203714CB.

Литература

1. *Ptashne M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **57**, 306 (1966).
2. *Jaskunas S. R., Lindahl L., Nomura M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 6 (1975).
3. *Brammar W. J.* In: Genetic Engineering, vol. 3, Williamson R. (ed.), Academic Press Inc., London, p. 53, 1982.
4. *Koshland D., Botstein D.* Cell, **20**, 749 (1980).
5. *Pène J. J., Murr P. C., Barrow-Carraway J.* J. Virol., **12**, 61 (1973).
6. *Miller J. H.* Experiments in Molecular Genetics, published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1972.

7. *Davis R. W., Botstein D., Roth J. R.* Advanced Bacterial Genetics, published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1980.
8. *Yamamoto K. R., Alberts B. M., Benzinger R., Lawhorne L., Treiber G.* J. Virol., 40, 734 (1970).
9. *Englesberg E., Wilcox G.* Annu. Rev. Genet., 8, 219 (1974).
10. *Hames B. D.* In: Gel Electrophoresis of proteins: A Practical Approach, Hames B. D. and Rickwood D. (eds.), IRL Press Ltd., Oxford, p. 1, 1981.
11. *Murialdo H., Siminovitch L.* In: The Bacteriophage Lambda, Hershey A. D. (ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. 711, 1971.
12. *Laskey R. A., Mills A. D.* Eur. J. Biochem., **56**, 335 (1975).
13. *Levine A., Ballone A., Devoret R.* J. Mol. Biol., **131**, 655 (1979).
14. *Hedgpeth J., Ballivet M., Eisen H.* Mol. Gen. Genet., **163**, 197 (1978).
15. *Lutkenhaus J. F., Wu H. C.* J. Bacteriol., **143**, 1281 (1980).
16. *Brammar W. J.* Biochem. Soc. Trans., **5**, 1633 (1977).
17. *Ward D. F., Murray N. E.* J. Mol. Biol., **133**, 249 (1979).
18. *Murray N. E., Kelley W. S.* Mol. Gen. Genet., **175**, 77 (1979).
19. *Wilson G. G., Murray N. E.* J. Mol. Biol., **132**, 471 (1979).
20. *Adler H. I., Fisher W. D., Cohen A., Hardigree A. A.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **57**, 321 (1967).
21. *Frazer A. C., Curtiss R.* Curr. Top. Microbiol. Immunol., **69**, 1 (1975).
22. *Dougan G., Sherratt D.* Mol. Gen. Genet., **151**, (1977).
23. *Meagher R. B., Tait R. C., Betlach M., Boyer H. W.* Cell, **10**, 521 (1974).
24. *Holmes D. S., Quigley M.* Anal. Biochem., **114**, 193 (1981).
25. *Birnboim H. C., Doly J.* Nucleic Acids Res., **7**, 1513 (1979).
26. *Dagert M., Ehrlich S. D.* Gene, **6**, 23 (1979).
27. *Morrison D. A.* In: Methods in Enzymology, vol. 68, Wu R. (ed.), Academic Press Inc., London and New York, p. 326, 1979.
28. *Levy S. B.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 2900 (1975).
29. *Reeve J.* In: Methods in Enzymology, vol. 68, Wu R. (ed.), Academic Press Inc., London and New York, p. 493, 1979.
30. *Clement J. M., Perrin D., Hedgpeth J.* Mol. Gen. Genet., **185**, 302 (1982).
31. *Hanawalt P. C., Cooper P. K., Ganesan A. K., Smith C. A.* Annu. Rev. Biochem., **48**, 783 (1979).
32. *Sancar A., Wharton R. P., Seltzer S., Kacinski B. M., Clarke N. D., Rupp W. D.* J. Mol. Biol., **148**, 45 (1981).
33. *Sancar A., Hack A. M., Rupp W. D.* J. Bacteriol., **173**, 692 (1979).
34. *Isberg R. R., Lazaar A. L., Syvanen M.* Cell, **30**, 883 (1982).
35. *Neu H. C., Fu K. P.* Antimicrob. Agents Chemother., **13**, 657 (1978).
36. *Reading C., Cole M.* Antimicrob. Agents Chemother., **11**, 852 (1977).
37. *Stoker N. G., Broome-Smith J. K., Edelman A., Spratt B. G.* J. Bacteriol., **155**, 847 (1983).
38. *Hedgpeth J., Clement J. M., Marchal C., Perrin D., Hofnung M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 2621 (1980).
39. *Teather R. M., Müller-Hill B., Abrulsch U., Aichele G., Overath P.* Mol. Gen. Genet., **159**, 239 (1978).
40. *Stoker N. G., Pratt J. M., Spratt B. G.* J. Bacteriol., 155, 854 (1983).

СОПРЯЖЕННЫЕ ПРОКАРИОТИЧЕСКИЕ БЕСКЛЕТОЧНЫЕ СИСТЕМЫ ТРАНСКРИПЦИИ — ТРАНСЛЯЦИИ

Дж. Пратт

1. Введение

В то время как у эукариот процессы транскрипции и трансляции часто изучают по отдельности, у прокариот эти сопряженные процессы, как правило, исследуют вместе. Неудачные попытки исследования систем трансляции, зависящих от бактериальных мРНК, объясняются главным образом двумя причинами. Во-первых, из бактерий (обычно используют для исследований *E. coli*) трудно выделить интактную мРНК из-за большого количества эндогенной нуклеазы, деградирующей мРНК во время выделения. Во-вторых, трансляция бактериальных мРНК обычно начинается, когда еще продолжается транскрипция (т. е. транскрипция и трансляция тесно сопряжены), тогда как у эукариот в обычных условиях мРНК не транслируется до завершения ее синтеза. Возможно, полностью синтезированные молекулы бактериальных мРНК не способны связываться с рибосомами из-за особенностей вторичной структуры в области сайта инициации. ДНК-зависимая бесклеточная система синтеза белка с сопряжением транскрипции и трансляции позволяет решить обе проблемы. Две такие наиболее широко используемые системы описаны в настоящей главе: предынкубированный экстракт *E. coli* S30, предложенный Зьюби [1, 2], и фракционированная система Голда и Швейгера [3].

2. Получение бесклеточной системы Зьюби

2.1. Введение

Бесклеточная система Зьюби [1, 2] представляет собой неочищенный экстракт *E. coli*, содержащий все ферменты и факторы, необходимые для транскрипции и трансляции; в этот экстракт добавляют аминокислоты, систему регенерации энергии и некоторые кофакторы. Со времени первых публикаций метод претерпел небольшие изменения [4, 5] и все шире используется в настоящее время. В последующих разделах подробно описана модифицированная методика, и если ей тщательно следовать, то получение активных экстрактов гарантировано.

Таблица 1. Приборы и оборудование, которые необходимо обработать ДЭПК и автоклавировать

4 пятилитровых колбы с ватными пробками
6 однолитровых колб с завинчивающимися крышками
16 полипропиленовых центрифужных пробирок на 50 мл с крышками
6 стаканов на 25 мл
4 мерных цилиндра на 100 мл
4 мерных цилиндра на 50 мл
6—10 колб Мак-Картни
3—4 больших магнита для магнитной мешалки
20—30 пастеровских пипеток
3 колбы Бюхнера на 100 мл
1 резиновая пробка для колбы Бюхнера
3 шпателя разных размеров
1 пестик гомогенизатора

2.2. Оборудование и реактивы

Всего для приготовления растворов понадобится 16 л воды. Обработайте воду диэтилпирокарбонатом (ДЭПК), чтобы инактивировать возможную рибонуклеазную активность. Для этого медленно добавьте под тягой при помешивании 1 мл ДЭПК на 1 л дистиллированной воды. Продолжайте перемешивание в течение 1 ч, затем автоклавируйте воду и храните ее при 4 °С.

Посуда и другое оборудование, необходимое для стандартного приготовления системы Зьюби, перечислены в табл. 1. Обработайте всю стеклянную посуду, центрифужные пробирки и пластиковые шланги ДЭПК. Для этого наполните или погрузите их в воду, в которой непосредственно перед обработкой был добавлен ДЭПК (1 мл на 1 л воды). Удалите раствор и немедленно автоклавируйте оборудование. Отрежьте 8—12 кусков диализной трубки диаметром 2,5 см и длиной 30—40 см и прокипятите их 20 мин в 0,1 м $NaHCO_3$, 10 мМ ЭДТА. Вылейте раствор и повторите процедуру 1—2 раза, пока раствор не перестанет быть коричневым. Тщательно ополосните трубки в воде, обработанной ДЭПК, и храните в стерильной воде с ДЭПК при +4 °С не дольше 1—2 дней[1].

Реактивы, необходимые для стандартного приготовления системы Зьюби, перечислены в табл. 2. Там же указаны фирмы, у которых мы обычно покупаем реактивы; вполне возможно, что им не уступают реактивы и других фирм. Приготовьте исходные растворы, перечисленные в табл. 3 и 4, используя воду, обработанную ДЭПК. Доведите pH щелочных растворов до требуемого значения уксусной кислотой (ледяной или разведенной в 10 раз

[1] Обработанные диализные трубки можно хранить в 30%-ном этаноле в течение многих месяцев. Перед употреблением их достаточно ополоснуть в растворе для диализа. — *Прим. перев.*

Таблица 2. Реактивы, необходимые для приготовления системы Зьюби

Реактив	Фирма[1]	Максимальная потребность
Ацетат аммония (Analar)	BDH Chemical Co.	5 г
Глюкоза (Analar)	То же	500 г
KH_2PO_4 (Analar)	»	200 г
K_2HPO_4 (Anaral)	»	1 кг
Ацетат кальция	Fisons Scientific Apparatus	5 г
Ледяная уксусная кислота	То же	100 мл
Ацетат магния·$4H_2O$ (Anaral)	»	500 г
ПЭГ-6000	»	5 г
Ацетат калия (SLR)	»	5 г
Аминокислоты (набор из 20 обычных аминокислот; табл. 4)	Sigma Chemical Co.	1 г (всего)
ATP (Na_2) из мышц лошади, свободный от ванадия	То же	2 г
3′, 5′-cAMP (Na)	»	100 мг
CTP (Na)	»	100 мг
ДЭПК	»	25 мл
DL-ДТТ	»	5 г
Фолиновая кислота (лейковорин кальция)	»	100 мг
GTP (Na)	»	100 мг
2-Меркаптоэтанол	»	20 мл
Фосфоенолпируват (К)	»	2 г
Пируваткиназа из мышц кролика (2000 ед./мл)	»	0,5 мл
Тиамин-HCl	»	100 мг
Трис	»	500 г
Транспортная РНК (деацилированная тРНК *E. coli*)	»	100 мг
UTP (Na) из дрожжей	»	100 мг
[^{35}S]-метионин (1000 Ки/ммоль; ~10 мкКи/мкл)	Amersham International	1 мКи
Дрожжевой экстракт	Oxoid	100 г

[1] Вполне возможно, что годятся реактивы, куплеиные и у других фнрм.

водой, обработанной ДЭПК), а кислых — 2 М трис. Разведенную уксусную кислоту и трис предварительно автоклавируйте. Налейте исходные растворы в стеклянную посуду, обработанную ДЭПК, автоклавируйте и храните, как указано в табл. 3. Наконец, приготовьте из этих исходных растворов смесь низкомолекулярных компонентов (НМ-смесь), как описано в табл. 5.

2.3. Получение клеток

Если для идентификации продуктов генов используют в качестве ДНК-матрицы плазмиды или фаг λ, то в качестве источника S30-экстракта лучше всего подходит штамм *E. coli* MRE600,

Таблица 3. Исходные растворы для системы Зьюби

Исходный раствор	Объем, мл	Потребность в автоклавировании	Температура хранения, °С
Смесь аминокислот А (табл. 4)	5	Нет	—20
Смесь аминокислот Б (табл. 4)	5	»	»
38 мМ ATP, pH 7,0	20	»	»
88 мМ CTP, 88 мМ GTP, 88 мМ UTR, pH 7,0	1	»	»
50 мМ 3′, 5′-cAMP, pH 7,0	1	»	»
0,10 М ДТТ	100	»	»
0,55 М ДТТ	5	»	»
Фолиевая кислота (2,7 мг/мл)	1	»	»
0,1 М ацетат магния	10	Да	4
1,4 М ацетат магния	500	»	»
3,0 М ацетат магния	100	»	»
Метионин (8 мг/мл)	1	Нет	—20
0,42 М фосфоенолпируват, pH 7,0	10	»	»
40%-ный ПЭГ-6000	10	Да	»
6,0 М ацетат калия	500	»	4
Исходный раствор солей: 1,4 М ацетат аммония, 2,8 М ацетат калия, 0,38 М ацетат кальция	10	»	—20
тРНК (17,4 мг/мл)	1	Нет	»
ТА-буфер (10 мМ трис-ацетат, pH 7,0)	500	Да	4
1,0 М трис-ацетат, pH 8,2	500	»	»
2,2 М трис-ацетат, pH 8,2	100	»	»
ТЭ-буфер (10 мМ трис-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 7,5)	500	»	»

так как он не содержит основную рибонуклеазную активность *E. coli* и его легко выращивать. Для исследований линейных молекул ДНК рекомендуется использовать штамм *recB*^{ts} (разд. 5.1.1). Для специальных работ, например для изучения регуляции экспрессии генов (разд. 4.4), экстракт можно получить из любого мутантного штамма.

1. Приготовьте 10 л неполной богатой среды, как указано в табл. 6.

2. Добавьте 800 мл 25%-ной (вес/объем) глюкозы и 100 мл 0,1 М ацетата магния (оба раствора должны быть автоклавированы).

3. Предынкубируйте среду при нужной температуре (обычно при 37 °С, в случае температурочувствительных штаммов — при 30 °С; разд. 5.1.1).

4. Инокулируйте среду ночной культурой нужного штамма, так чтобы $A_{450}=0{,}07$.

Таблица 4. Приготовление смесей аминокислот

Аминокислота	Навески, мг	
	смесь А	смесь Б
Аланин	22	25
Аргинин-HCl	53	58
Аспарагин	33	36
Аспарагиновая кислота	33	37
Цистеин	30	33
Глутаминовая кислота	37	41
Глутамин	37	40
Глицин	19	21
Гистидин-HCl	48	53
Изолейцин	33	36
Лейцин	33	36
Лизин	46	50
Метионин	37	—
Фенилаланин	31	34
Пролин	29	32
Серин	26	29
Треонин	30	33
Триптофан	51	56
Тирозин	45	50
Валин	29	32

Для приготовления смесей растворите перечисленные аминокислоты в 5 мл воды (конечный объем). Конечная концентрация аминокислот в смеси А — 50 мМ, а в смеси Б — 55 мМ.

Таблица 5. Приготовление смеси низкомолекулярных компонентов (НМ-смеси)

Исходный раствор	Объем, мкл	Конечная концентрация в реакционной смеси
2,2 М трис-ацетат, pH 8,2	40	56,4 мМ
0,55 М ДТТ	5	1,76 мМ
38 мМ ATP, pH 7,0	50	1,22 мМ
88 мМ CTP, 88 мМ GTP, 88 мМ UTP, pH 7,0	15	0,85 мМ
0,42 М фосфоенолпируват, pH 7,0	100	27,0 мМ
Смесь аминокислот Б (без метионина)	10	0,35 мМ
40%-ный ПЭГ-6000	75	1,9%
Фолиевая кислота (2,7 мг/мл)	20	34,6 мкг/мл
50 мМ 3′, 5′-cAMP, pH 7,0	20	0,64 мМ
тРНК (17,4 мг/мл)	15	0,17 мг/мл
Исходный раствор солей:		
1,4 М ацетат аммония	40	36,0 мМ
2,8 М ацетат калия		72,0 мМ
0,38 М ацетат кальция		9,7 мМ

Смешайте компоненты в указанном порядке, разделите раствор на аликвоты по 100 мкл и храните их при —20 °С. При этой температуре НМ-смесь сохраняет активность не менее 2—3 мес.

Таблица 6. Приготовление неполной богатой среды

KH_2PO_4	56 г
K_2HPO_4	289 г
Дрожжевой экстракт	10 г
Тиамин	15 мг
Каждая из необходимых аминокислот[1]	0,5 г
Дистиллированная вода до 10 л	

Проавтоклавируйте среду 45 мин при 1 атм.

[1] Клетки *E. coli* MRE600 не нуждаются ни в каких аминокислотах.

5. Во время инкубации интенсивно аэрируйте культуру встряхиванием или пропусканием через ферментер протока воздуха, пока A_{450} не достигнет 1,5—2,0 (обычно культуру растят в течение ночи).

6. В день опыта приготовьте буфер для промывки клеток (S30-буфер), смешав по 10 мл следующих исходных растворов (табл. 3): 1,4 М ацетата магния; 6,0 М ацетата калия; 0,1 М ДТТ; 1,0М трис-ацетата, pH 8,2. Затем добавьте воду, обработанную ДЭПК, до 1 л и храните буфер при +4 °С.

7. Соберите клетки центрифугированием при 10 000 *g* в течение 15 мин при 4 °С.

8. Промойте клетки 3 раза 500 мл охлажденного S30-буфера с добавлением 0,5 мл 2-меркаптоэтанола на 1 л и определите вес сырой массы клеток.

9. Храните клетки в виде осадка при —70 °С не дольше 1—2 дней.

2.4. Получение S30-экстракта

1. Тщательно очистите рабочую камеру френч-пресса (лучше это сделать накануне эксперимента). Промойте детали камеры водой, обработанной ДЭПК, и присоедините кусок гибкого шланга длиной около 60 см к боковому отводу. Соберите ячейку и наполните ее водой, обработанной ДЭПК. Прикройте ячейку и шланг фольгой и храните при +4 °С.

2. В день получения S30-экстракта приготовьте свежий S30-буфер, как описано в разд. 2.3, стадия 6.

3. Достаньте осадок клеток (разд. 2.3, стадия 9) из холодильника на —70 °С и дайте ему оттаять в течение 30—60 мин при +4 °С.

4. Медленно ресуспендируйте клетки в S30-буфере, содержащем 2-меркаптоэтанол (0,05 мл/л), из расчета 100 мл буфера на 10 г клеток.

5. Отцентрифугируйте суспензию 30 мин при 16 000 *g* при 4 °С и взвесьте осадок.

6. Тщательно ресуспендируйте клетки. Для этого поместите их в колбу Бюхнера и добавьте 63,5 мл S30-буфера на 50 г клеток. Присоедините колбу резиновым шлангом к вакуумному насосу и закройте ее резиновой пробкой. Откачайте воздух из колбы. Выньте пробку и суспендируйте клетки, помешивая их тефлоновым пестиком из гомогенизатора. Через небольшие промежутки времени откачивайте воздух из колбы, чтобы ресуспендировать клетки по возможности в анаэробных условиях. Важно разбить комочки клеток. Обычно это легко сделать, просто помешивая пестиком суспензию клеток и раздавливая комочки. Вместе с тем клетки некоторых штаммов, например *recB*^{ts}, иногда очень трудно ресуспендировать. Тогда приходится очень осторожно гомогенизировать их в гомогенизаторе с большим зазором. Однако к гомогенизации желательно по возможности не прибегать.

7. Измерьте объем ресуспендированных клеток и перенесите их в лед. Залейте клетки в рабочую ячейку френч-пресса пипеткой на 10 мл, стараясь не внести туда большие комки клеток. Следите за тем, чтобы в камере не появлялись пузыри воздуха.

8. Пропустите клетки через пресс при давлении ~590 атм. и соберите лизат во льду. Добавьте 100 мкл 0,1 М ДТТ на 10 мл собранного лизата. На этой стадии препарат может быть еще вязким и мутным. Оставшиеся целые клетки удаляют при последующем центрифугировании. Повторно пропускать материал через френч-пресс для более полного разрушения клеток не рекомендуется, так как это приводит к потере активности.

9. Немедленно отцентрифугируйте препарат в течение 30 мин при 30 000 *g* при 4 °С. Тем временем нагрейте водяной термостатируемый встряхиватель с вращающейся платформой до 37 °С. Разморозьте растворы, необходимые для приготовления среды для предынкубации (табл. 7).

10. После центрифугирования (стадия 9) перенесите верхние $^4/_5$ супернатанта в чистую пробирку. Определите объем суперна-

Таблица 7. Приготовление смеси для предынкубации[1]

Смешайте следующие исходные растворы[2]:	
Пируваткиназа	25 мкл
2,2 М трис-ацетат, pH 8,2	1,0 мл
3,0 М ацетат магния	23 мкл
38 мМ АТР, pH 7,0	2,6 мл
0,42 М фосфоенолпируват, pH 7,0	1,5 мл
0,55 М ДТТ	60 мкл
Смесь аминокислот А	6 мкл
Дистиллированная вода, обработанная ДЭПК, до 7,5 мл	

[1] Смесь для предынкубации готовят непосредственно перед использованием.
[2] Состав исходных растворов приведен в табл. 2—4.

танта и снова отцентрифугируйте его 30 мин при 30 000 *g* при 4 °С. Тем временем приготовьте 7,5 мл среды для предынкубации (табл. 7) на каждые 25 мл супернатанта.

11. После центрифугирования (п. 10) перенесите верхние $^4/_5$ супернатанта в небольшую коническую колбу. Измерьте объем и добавьте 7,5 мл среды для предынкубации на каждые 25 мл супернатанта. Накройте колбу фольгой и инкубируйте ее, осторожно покачивая на водяной бане (или в воздушном термостате с вращающейся платформой) 80 мин при 37 °С (или 160 мин при 30 °С в случае температурочувствительных штаммов; разд. 5.1.1).

12. Поместите смесь в подготовленные трубки для диализа (разд. 2.2) и диализуйте против 50 объемов S30-буфера при 4 °С. Трижды смените S30-буфер, диализуя по 45 мин против каждой смены.

13. Центрифугируйте экстракт 10 мин при 4000 *g* при 4 °С. Разделите супернатант на аликвоты по 0,5—2 мл и храните их в жидком азоте. Если за контейнером с жидким азотом постоянно следить, эти экстракты будут давать воспроизводимую активность в течение многих лет.

2.5. Оптимизация системы

2.5.1. Выделение плазмидной ДНК

Для оптимизации системы необходимо примерно 50 мкг плазмидной ДНК. Обычно мы проверяем активность вновь приготовленных экстрактов с многокопийной плазмидой pBR325. Ее преимущество состоит в том, что она дает два легко идентифицируемых продукта — β-лактамазу и хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT). Однако может оказаться подходящей и любая другая многокопийная плазмида, например pBR322, pAT153, pACYC184. Надежная методика выделения плазмидной ДНК приведена в табл. 8.

Таблица 8. Выделение плазмидной ДНК

1. Вырастите 400 мл культуры бактерии-хозяина в питательном бульоне (2,5% сухого питательного бульона в воде), содержащем необходимые антибиотики, до поздней логарифмической фазы (например, до $A_{450}=0{,}8$) при 37 °С.
2. Добавьте хлорамфеникол (170 мкг/мл) или спектиномицин (300 мкг/мл) для амплификации плазмиды и продолжайте инкубацию при 37 °С в течение ночи[1].
3. Охлаждайте клетки 10 мин при 4 °С. Затем отцентрифугируйте их 10 мин при 4000*g* при 4 °С (например, в роторе Sorvall GS3 при 5000 об/мин).
4. Промойте клетки центрифугированием в 40 мл бактериального буфера (20 мМ KH_2PO_4, 50 мМ Na_2HPO_4, 70 мМ NaCl, 40 мкМ $MgSO_4$, pH 7,0).
5. Ресуспендируйте клетки в 3 мл 25%-ной сахарозы, 50 мМ трис-HCl, pH 8,0, и затем добавьте 0,5 мл смеси лизоцима (10 мг/мл) и РНКазы (300 мкг/мл).

6. Проинкубируйте 5 мин при комнатной температуре. Затем добавьте 4 мл 2%-ного (по весу) тритона X-100, 50 мМ трис-HCl, pH 8,0, и переверните пробирку с клетками несколько раз, пока не пройдет полный лизис.
7. Отцентрифугируйте 20 мин при 39 000*g* при 4 °С (например в роторе Sorvall SS34 при 18 000 об/мин).
8. Слейте супернатант в поликарбонатную пробирку и добавьте $^2/_3$ объема 1,25 М NaCl, 25%-ного (вес/объем) ПЭГ (мол. масса 6000). Оставьте во льду не менее чем на 1 ч.
9. Отцентрифугируйте 10 мин при 4000*g* при 4 °С (например, в роторе Sorvall HB4 при 5000 об/мин).
10. Ресуспендируйте осадок в объеме точно 1,1 мл 5 мМ ЭДТА, 50 мМ NaCl, 50 мМ трис-HCl, pH 8,0, и перенесите раствор в пробирку вертикального ротора Beckman VTi 65[2]. Подслоите под образец 4 мл раствора CsCl, содержащего бромистый этидий[3], и заплавьте пробирку. Отцентрифугируйте 3 ч при 300 000*g* или в течение ночи при 230 000*g* при 15 °С (ротор VTi65, 55 000 или 50 000 об/мин соответственно).
11. После центрифугирования найдите полосы ДНК, осветив пробирку УФ-светом. Отберите полосу плазмидной ДНК, проткнув стенку сбоку шприцем. Удалите бромистый этидий экстракцией изопропанолом, насыщенным CsCl.
12. Диализуйте препарат плазмидной ДНК против трех смен ТЭ-буфера (10 мМ трис, pH 7,5, 1 мМ ЭДТА).
13. Перенесите раствор ДНК в силиконированную стеклянную (Corex) центрифужную пробирку. Добавьте 3М ацетат натрия, pH 5,6 до 0,3 М, а затем 2,5 объема этанола. Оставьте на 3—4 ч при —20 °С.
14. Отцентрифугируйте плазмидную ДНК 10 мин при 16 000*g* при —10 °С (например, в роторе Sorvall HB4 при 10 000 об/мин).
15. Высушите осадок ДНК под вакуумом. Ресуспендируйте осадок в 1 мл ТЭ-буфера и экстрагируйте раствор дважды равным объемом фенольной смеси[4].
16. Дважды экстрагируйте препарат диэтиловым эфиром, чтобы удалить остатки фенола, а затем осадите плазмидную ДНК из водной фазы, как описано в пп. 13 и 14.
17. Ресуспендируйте плазмидную ДНК в ТЭ-буфере в концентрации 200—500 мкг/мл.

[1] Если плазмида не может амплифицироваться, выделяйте ее из 400 мл культуры клеток-хозяев, выращенных в течение ночи при 37 °С.

[2] При соблюдении соотношения объемов раствора ДНК и раствора CsCl с бромистым этидием общий объем можно менять, чтобы он подходил к имеющимся центрифужным пробиркам и роторам. Например, можно проводить центрифугирование при 82 000 g течение 40 ч в роторе Beckman 50Ti (скорость 30 000 об/мин).

[3] Раствор готовят следующим образом. Смешайте 80 г CsCl, 8 мл раствора бромистого этидия (5 мг/мл) и 52 мл 5 мМ ЭДТА, 50 мМ NaCl, 50 мМ трис-HCl, pH 8,0. Если это необходимо, доведите показатель преломления до 1,3990—1,4000, добавляя CsCl или разбавляя раствор.

[4] Фенольная смесь состоит из 100 г фенола, 4 мл изоамилового спирта, 0,1 г 8-гидроксихинолина и 100 мл хлороформа. Такую фенольную смесь хранят под 10 мМ трис-HCl, pH 7,5, при 4 °С.

2.5.2. Определение оптимальных концентраций ионов магния и S30-экстракта

Наш опыт показывает, что, каким бы методом ни была выделена плазмидная ДНК, важно, чтобы она не была загрязнена РНКазой, хлоридом цезия, этанолом, агарозой или большим количеством солей. Эти, казалось бы очевидные, требования нужно всегда иметь в виду, поскольку именно примеси в препарате ДНК обычно подавляют ее активность в качестве матрицы при

Таблица 9. Определение оптимальной концентрации ионов магния[1]

№ пробирки	Объем мкл						
	ДНК[2]	[^{35}S]-метионин	НМ-смесь	0,1 М ацетат магния	ТА-буфер	ТЭ-буфер	S30-экстракт[3]
1	5,0	2,0	7,5	2,0	8,5	—	5,0
2	5,0	2,0	7,5	2,5	8,0	—	5,0
3	5,0	2,0	7,5	3,0	7,5	—	5,0
4	5,0	2,0	7,5	3,5	7,0	—	5,0
5	5,0	2,0	7,5	4,0	6,5	—	5,0
6	—	2,0	7,5	3,5	2,0	5,0	5,0
7	5,0	2,0	7,5	2,5	5,0	—	8,0
8	5,0	2,0	7,5	3,5	4,0	—	8,0
9	—	2,0	7,5	3,5	—	4,0	8,0

[1] Состав компонентов, за исключением раствора ДНК и S30-экстракта, приведен в табл. 2—5.
[2] Раствор плазмидной ДНК (например, pBR325) в ТЭ-буфере в концентрации 300—500 мкг/мл.
[3] Приготовление экстракта описано в разд. 2.4.

инкубации in vitro. Как правило, эту проблему можно решить с помощью нескольких экстракций фенолом, осаждения этанолом и диализа.

Как показывает наш опыт, оптимальная концентрация магния для синтеза белка в системе Зьюби составляет 10—15 мМ. Более точно эту концентрацию определяют для данного препа-

Таблица 10. Определение включения радиоактивности в белок

Данная методика позволяет обрабатывать одновременно много образцов в одинаковых условиях и дает весьма воспроизводимые результаты.

1. Нанесите 2—5 мкл из каждой радиоактивной пробы на отдельный кружок фильтровальной бумаги Whatman 3 MM, пронумерованный карандашом. Подсушите при комнатной температуре.
2. Погрузите фильтры по одному в 200 мл ледяной 10%-ной ТХУ, содержащей 0,1% метионина. Оставьте их во льду на 1 ч, время от времени встряхивая.
3. Перенесите фильтры в 200 мл 5%-ной ТХУ, содержащей 0,1% метионина. Инкубируйте 10 мин при 90 °С.
4. Слейте ТХУ и залейте 200 мл свежего раствора 5%-ной ТХУ, 0,1%-ного метионина.
5. Меняйте смесь ТХУ — метионин каждые 15 мин (3—4 смены).
6. Слейте ТХУ и залейте фильтры минимальным количеством ацетона, чтобы он только покрыл их. Встряхните и слейте ацетон.
7. Налейте свежую порцию ацетона и оставьте при комнатной температуре на 10 мин.
8. Выньте фильтры пинцетом по одному и подсушите при комнатной температуре.
9. Поместите каждый фильтр в отдельную кювету для измерения радиоактивности, залейте сцинтилляционную жидкость и просчитайте на счетчике.

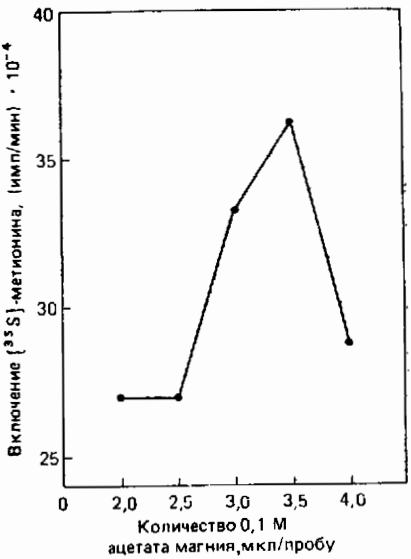


Рис. 1. ТХУ-нерастворимая радиоактивность в пробах 1—5 опыта по определению оптимальной концентрации магния (табл. 9). В качестве матрицы использовали ДНК плазмиды pBR325 в концентрации 300 мкг/мл.

рата экстракта, изменяя концентрацию ионов магния и проверяя включение радиоактивности в аликвотах в ТХУ-нерастворимую фракцию. Иногда приходится также определить оптимальную концентрацию S30-экстракта. В табл. 9 приведены результаты типичного опыта по определению оптимальных концентраций ионов магния и S30-экстракта. Пробы 1—6 предназначены для определения оптимальных концентраций магния (проба 6 — контроль, не содержащий ДНК), а пробы 7—9 позволяют проверить влияние увеличения концентрации S30-экстракта (проба 9 также представляет собой контроль без ДНК). Опыт ставят следующим образом.

1. Добавьте указанное в табл. 9 количество [^{35}S]-метионина, НМ-смеси, ТА-буфера, ТЭ-буфера, ацетата магния и ДНК в пронумерованные стерильные микроцентрифужные пробирки во льду.

2. Отцентрифугируйте пробирки 15 с в микроцентрифуге, чтобы собрать все компоненты на дне пробирок.

3. Предынкубируйте пробирки 2—4 мин в водяной бане со встряхивателем при 37 °С.

4. В каждую пробирку добавьте S30-экстракт, тщательно перемешивая смесь кончиком для микропипетки (в каждой пробе своим). Поставьте пробирки обратно в водяную баню.

5. После добавления S30-экстракта во все пробирки продолжайте инкубацию при 37 °С в течение 30—60 мин, встряхивая пробирки как можно интенсивнее, чтобы их содержимое как

следует перемешивалось. Это необходимо для хорошего включения [1, 6].

6. Добавьте в каждую пробирку по 10 мкл предварительно нагретого (37 °С) немеченого L-метионина (8 мг/мл в воде, обработанной ДЭПК), перемешайте и инкубируйте еще 5 мин, чтобы завершить синтез меченых полипептидов.

7. Перенесите пробирки в лед. Через 10 мин быстро перемешайте содержимое каждой пробирки встряхиванием. Нанесите аликвоты (2—5 мкл) на пронумерованные кружки фильтровальной бумаги Whatman 3MM для определения включения [^{35}S]-метионина в белки. Эта процедура описана в табл. 10. Результаты типичного эксперимента показаны на рис. 1: при добавлении 3,5 мкл 0,1 М ацетата магния на стандартный объем инкубационной смеси наблюдали оптимальное включение [^{35}S]-метионина в белок, т. е. оптимальная концентрация магния составила 11,7 мМ.

8. Добавьте к остальной инкубационной смеси 30 мкл ТА-буфера и 30 мкл 20%-ного глицерола, 2%-ного ДСН, 5%-ного 2-меркаптоэтанола, 0,001%-ного (вес/объем) бромфенолового синего, 0,125 М трис-HCl pH 6,8.

9. Прокипятите образцы 3 мин и проанализируйте меченые полипептиды электрофорезом в ПААГ — ДСН, нанося не более 50 мкл каждого образца в ячейку.

На рис. 2 (дорожки 1—6) показан результат электрофореза в ПААГ — ДСН образцов, полученных в эксперименте по определению оптимальной концентрации магния (рис. 1). Видно, что в этом опыте добавление 3,5 мкл 0,1 М ацетата магния на стандартную инкубационную смесь дает максимальное включение [^{35}S]-метионина в полипептидные продукты. Однако следует отметить, что оптимальные значения концентрации магния, полученные по определению ТХУ-нерастворимой метки и по электрофорезу в ПААГ — ДСН, не всегда совпадают. Например, максимальное включение в ТХУ-нерастворимые продукты иногда является результатом нарушения правильности транскрипции, так как высокая концентрация ионов магния облегчает инициацию транскрипции не только в правильных местах, но и на таких участках, которые в норме не используются. В результате образуются транскрипты, которые дают при трансляции неправильные полипептиды; при этом наблюдается повышенное включение в ТХУ-нерастворимую фракцию, но электрофорез в ПААГ — ДСН дает аномальный спектр полипептидов. Кроме того, при высокой концентрации ионов магния нарушается правильность трансляции, так как происходит инициация этого процесса на новых участках помимо правильных мест инициации; это также приводит к повышенному включению метки, но аномальному спектру белков. Пример такого расхождения между данными

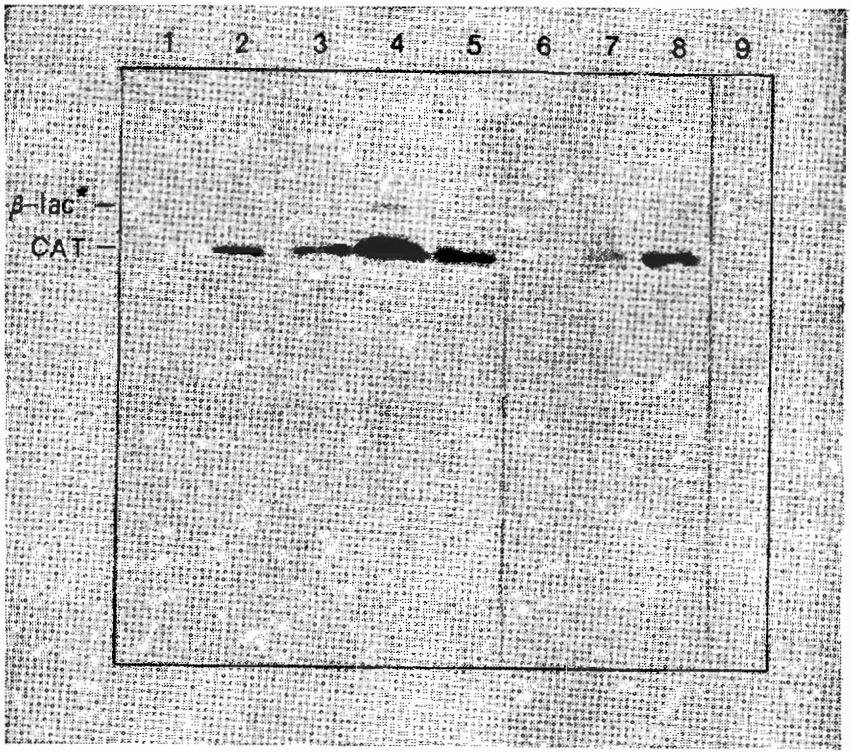


Рис. 2. Анализ полипептидов, синтезированных в различных пробах опыта по определению оптимальной концентрации магния (рис. 1), с помощью электрофореза в 15%-ном пластинчатом ПААГ — ДСН и радиоавтографии. Дорожки 1—9 соответствуют пробам 1—9 в табл. 9. Полипептидные продукты, синтезирующиеся с использованием в качестве матрицы ДНК плазмиды pBR325, — предшественник β-лактамазы (β-lac*) и хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT).

по ТХУ-нерастворимой радиоактивности и электрофорезом показан на рис. 1 и 2. Хотя, судя по ТХУ-нерастворимой радиоактивности, включение в пробы 1 и 2 одинаково (рис. 1), радиоактивность в первом из этих образцов, судя по рис. 2, включилась в низкомолекулярные пептиды, слишком короткие, чтобы их можно было увидеть при электрофорезе в ПААГ—ДСН, но достаточно длинные, чтобы они осаждались ТХУ. Во всех случаях, когда наблюдается такое расхождение, решающим критерием при выборе концентрации ионов магния является именно электрофорез в ПААГ — ДСН.

Фоновое включение [^{35}S]-метионина в S30-экстракте, которое определяют по ТХУ-нерастворимой радиоактивности в контроль-

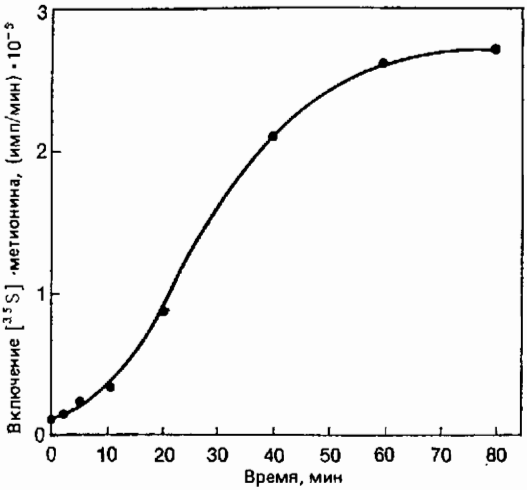


Рис. 3. Кинетика включения [^{35}S]-метионина в полипептиды in vitro. Реакцию проводили с использованием в качестве матрицы 2 мкг ДНК плазмиды pBR325 в присутствии S30-экстракта из клеток *E. coli* MRE600.

ной пробе, не содержащей плазмидной ДНК (табл. 9, проба 6), варьирует в зависимости от концентрации ионов магния. Но при насыщающих концентрациях ДНК стимуляция включения по сравнению с контролем должна достигать 40—60 раз. Если экстракт дает более чем 10-кратную стимуляцию, этого обычно достаточно для получения вполне приемлемых результатов. Естественно, в контрольной смеси не должно быть кодируемых плазмидой полипептидов при анализе в ПААГ — ДСН (рис. 2, дорожка 6).

На рис. 2, дорожки 7—9, приведены результаты анализа проб 7—9 (табл. 9) с помощью электрофореза в ПААГ — ДСН. Если сопоставить их с дорожками 2 и 4 того же рисунка, то видно, что для максимального синтеза полипептидов с имеющейся в смеси матрицы 5 мкл S30-экстракта достаточно. Следует отметить, что при увеличении количества S30-экстракта включение часто падает.

2.5.3. Кинетика включения метки

После определения оптимальных концентраций магния и S30-экстракта в системе следует построить кривую зависимости включения метки от времени.

1. Приготовьте инкубационную смесь вдвое большего объема, чем обычно (т. е. 60 мкл), и отбирайте аликвоты по 2 мкл

на пронумерованные кружки фильтровальной бумаги Whatman 3ММ через различные промежутки времени.

2. Высушите фильтры, осадите меченые полипептидные продукты ТХУ, промойте фильтры и определите радиоактивность, как описано в табл. 10.

Синтез белка должен идти с высокой скоростью в течение по крайней мере 40 мин. Результат типичного эксперимента приведен на рис. 3.

3. Получение бесклеточной системы Голда и Швейгера

3.1. Введение

Другой способ получения бесклеточной системы транскрипции — трансляции был описан Голдом и Швейгером [3]. Он включает фракционирование различных компонентов клеток *E. coli* и последующую реконструкцию активной системы. Эта система используется так же широко, как и система Зьюби (разд. 2).

3.2. Оборудование и реактивы

Подготовьте стерильную стеклянную посуду, центрифужные пробирки и диализные трубки. Приготовьте исходные растворы, перечисленные в табл. 11, и храните их при —20 °С (кроме буфера А). При этой температуре растворы можно хранить 2—3 мес.

3.3. Получение клеток

Выбор штамма *E. coli* определяется теми же соображениями, что и в случае получения S30-экстракта для системы Зьюби; читатель может вернуться к ним в разд. 2.3. Для изучения препаратов линейных ДНК можно использовать штамм *recB* (разд. 5.1.2).

1. Приготовьте 10 л богатой среды, как описано в табл. 12.

2. Предынкубируйте среду при нужной температуре и проинокулируйте ее ночной культурой соответствующего штамма *E. coli*, чтобы A_{450} было равно 0,07.

3. Проинкубируйте клетки при 37 °С с интенсивной аэрацией (встряхиванием), пока A_{450} не достигнет 0,6—0,7 (ранняя логарифмическая фаза; концентрация клеток $\simeq 2 \cdot 10^8$ клеток/мл).

4. Соберите клетки центрифугированием в течение 15 мин при 10 000 *g* при 4 °С.

Таблица 11. Исходные растворы для системы Голда и Швейгера[1]

Исходный раствор	Объем	Потребность в автоклавировании	Температура хранения, °С
Буфер А: 10 мМ трис-HCl, pH 7,5; 10 мМ ацетат магния; 22 мМ ацетат аммония; 1 мМ ДТТ	2 л	Да	4
Аминокислоты (5 мМ каждая)[2]	5 мл	Нет	—20
0,2 М ATP[3]	2 мл	»	»
0,2 М CTP[3]	0,5 мл	»	»
0,2 М GTP[3]	0,5 мл	»	»
0,2 М UTP[3]	0,5 мл	»	»
1,0 М ДТТ	2 мл	»	»
6 мМ фолиновая кислота	0,5 мл	»	»
0,12 М ацетат магния	10 мл	Да	»
1,0 М фосфоенолпируват	5 мл	Нет	»
2,0 М ацетат калия	10 мл	Да	»
тРНК (деацилированная тРНК *E. coli*, 10 мг/мл)	1 мл	Нет	»
1,0 М трис-ацетат, pH 8,0	20 мл	Да	»
Радиоактивная аминокислота[4]	—	—	—

[1] Для приготовления этой системы можно использовать те же реактивы, что и для системы Зъюби (табл. 2).

[2] В смесь входят все 20 обычных аминокислот, кроме той, которая используется в качестве радиоактивного предшественника.

[3] pH этих растворов перед использованием не подводят (табл. 13).

[4] Обычно используют [^{3}H]-лейцин (5 мкКи/мкл; 150 Ки/ммоль) или [^{35}S]-метионин (10 мкКи/мкл; 1000 Ки/ммоль).

Таблица 12. Приготовление богатой среды

Приготовьте и проавтоклавируйте растворы I, II и III по отдельности:

Раствор I

Бакто-пептон	100 г
Глицерол	238 мл
$CaCl_2$	0,33 г
Желатина	0,10 г
NH_4Cl	10,0 г
$MgSO_4 \cdot 4H_2O$	3,0 г
Дистиллированная вода до 500 мл	

Раствор II

Растворите 50 г глюкозы в 500 мл дистиллированной воды

Раствор III

K_2HPO_4	90,0 г
KH_2PO_4	34,5 г
Дистиллированная вода до 300 мл	

Чтобы приготовить богатую среду, смешайте проавтоклавированные растворы I, II и III и доведите объем до 10 л стерильной дистиллированной водой.

5. Промойте клетки 250 мл буфера А (табл. 11), приготовленного перед опытом и хранящегося при 4 °С. Повторите такую промывку еще дважды и определите сырой вес клеток.

6. Храните клетки в виде осадка в жидком азоте, пока они не понадобятся.

3.4. Получение бесклеточного экстракта

Если условия не указаны, проводите все операции при 4 °С.

1. Промойте гомогенизатор Sorvall Omnimix и достаточное количество стеклянных шариков (40 г на 10 г клеток) стерильной водой и храните их при 4 °С. Желательно сделать это за день до эксперимента. Голд и Швейгер использовали стеклянные шарики Superbrite 100 (Minnesota Mining Co). Кроме того, приготовьте колонку (1×10 см), содержащую 5 г ДЭАЭ-целлюлозы (Serva), промойте ее 50 мл буфера А (табл. 11) и храните при +4 °С.

2. Смешайте 10 г клеток с 10 мл холодного буфера А и 40 г промытых стеклянных шариков.

3. Разрушьте клетки в Sorvall Omnimix на максимальной скорости в течение 3 мин.

4. Отцентрифугируйте препарат 5 мин при 16 000 *g*, чтобы удалить стеклянные шарики.

5. Отцентрифугируйте супернатант 20 мин при 154 000 *g*. Отберите супернатант.

6. Отцентрифугируйте супернатант 90 мин при 198 000 *g*, чтобы осадить рибосомы. Оставьте супернатант во льду до стадии 10 и займитесь осадком рибосом.

7. Ресуспендируйте рибосомы примерно в 10 мл буфера А и проинкубируйте их 90 мин при 37 °С.

8. Отцентрифугируйте суспензию 10 мин при 12 000 *g*, отбросьте осадок и снова отцентрифугируйте супернатант 90 мин при 198 000 *g*, чтобы еще раз осадить рибосомы.

9. Ресуспендируйте рибосомы в буфере А в концентрации 100 мг/мл (исходя из того, что этой концентрации соответствует $A_{260}=1480$) и храните суспензию в аликвотах в жидком азоте, пока она не понадобится.

10. Нанесите супернатант, полученный на стадии 6, на приготовленную колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (п. 1) и промойте колонку 50 мл буфера А.

11. Элюируйте белок с колонки ДЭАЭ-целлюлозы буфером А, содержащим 0,25 М хлористый аммоний, определяя во фракциях A_{280}. Объедините фракции, соответствующие белковому пику.

12. Разделите элюированный белок на аликвоты и храните их в жидком азоте.

Рибосомы служат источником факторов инициации. Они мо-

гут храниться в жидком азоте до 3 мес. Белковая фракция содержит ферменты, активирующие аминокислоты, факторы элонгации T и G и бóльшую часть ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Концентрация белка в этой фракции должна составлять 8—10 мг/мл; при хранении в жидком азоте белковая фракция стабильна в течение по крайней мере 3 мес.

3.5. Оптимизация системы

Как и в случае системы транскрипции — трансляции in vitro Зыоби (разд. 2.5.2), в системе Голда и Швейгера необходимо определить оптимальную концентрацию ионов магния. Обычно

Таблица 13. Инкубационная смесь для системы Голда и Швейгера[1]

1. Приготовьте следующие смеси:

Смесь I:

1,0 М трис-ацетат, pH 8,0	0,50 мл
2,0 М ацетат калия	0,25 мл
Аминокислоты (5 мМ каждая)	0,40 мл
1,0 М ДТТ	20 мкл
Вода до конечного объема 2 мл	

Смесь II:

0,2 М ATP	0,20 мл
0,2 М CTP	50 мкл
0,2 М GTP	50 мкл
0,2 М UTP	50 мкл
1,0 М фосфоенолпируват	0,40 мл

Добавьте раствор KOH, чтобы довести pH до 6,5, и затем добавьте воды до конечного объема 1,0 мл.

2. Для составления реакционной смеси смешайте исходные растворы в следующих соотношениях:

Исходный раствор	*Объем, мкл*
Смесь I	20[2]
Смесь II	5[2]
тРНК (10 мг/мл)	5
6 мМ фолиновая кислота	5
0,12 М ацетат магния	5
Белковая фракция[3]	40
Рибосомы[3]	100
ДНК (100—600 мкг/мл)[4]	10
Радиоактивная аминокислота[5]	100

[1] Состав исходных растворов приведен в табл. 11.

[2] Остаток смесей I и II можно хранить в аликвотах при —70 °C для дальнейшего использования.

[3] Приготовление этих компонентов описано в разд. 3.4. При оптимизации системы их объемы можно варьировать в диапазоне ±50%.

[4] Плазмидная ДНК (например, pBR325).

[5] Обычно используют [^{3}H]-лейцин (5 мкКи/мкл, 150 Ки/ммоль) или [^{35}S]-метионин (10 мкКи/мкл, 1000 Ки/ммоль).

она составляет 11—15 мМ. Кроме того, следует поварьировать объемы рибосомной и белковой фракций, пока не будет достигнут оптимальный уровень синтеза. Для каждой из процедур оптимизации подготовьте инкубационные смеси путем смешивания растворов, перечисленных в табл. 13. Как и в системе Зьюби, в качестве матрицы в этих опытах лучше всего использовать ДНК какой-либо многокопийной плазмиды (разд. 2.5.1). После инкубации в течение 40 мин при 37 °С определите включение радиоактивной аминокислоты в белок путем осаждения ТХУ, как описано в табл. 10, и проанализируйте продукты инкубации электрофорезом в ПААГ — ДСН (разд. 2.5.2).

Найдя оптимальный состав инкубационной смеси, следует определить кинетику системы транскрипции — трансляции, как было описано выше (2.5.3). Синтез белка должен идти с высокой скоростью в течение по крайней мере 40 мин.

3.6. Модификация основной методики

Многие исследователи вносили небольшие изменения в процедуру Голда и Швейгера. Подробнее познакомиться с этими изменениями и примерами можно в статьях [6, 7].

4. Использование в качестве матриц ДНК плазмид или фага λ

4.1. Экспериментальные подходы

Реакционные смеси, приготовленные по методу Зьюби (разд. 2.5) или Голда и Швейгера (разд. 3.5), позволяют исследовать в системе с нативной рекомбинантной ДНК в качестве матрицы любые гены, клонированные в плазмидных векторах или в фаге λ. Выделение плазмидной ДНК было описано выше (табл. 8), а методика для выделения ДНК фага λ дана в табл. 14. Выбор штамма *E. coli* для получения бесклеточного экстракта определяется целями эксперимента: обычно для идентификации продуктов клонированных генов (разд. 4.2) и предшественников белков (разд. 4.3) используют штаммы MRE600; для изучения регуляции экспрессии генов более подходящими могут оказаться другие штаммы (разд. 4.4). Инкубацию проводят при оптимальных концентрациях ионов магния и экстракта, а затем полипептидные продукты характеризуют с помощью электрофореза в ПААГ — ДСН (разд. 2.5.2).

4.2. Идентификация продуктов клонированных генов

Сравнивая меченые полипептидные продукты, полученные в системе после добавления вектора клонирования (плазмиды или фага λ), с продуктами рекомбинантной ДНК, можно иден-

Таблица 14. Выделение фаговой ДНК

1. Выделите фаг, как описано в гл. 6, табл. 5, и очистите его центрифугированием в ступенчатом градиенте плотности CsCl, как описано в гл. 6, табл. 7.
2. После центрифугирования отберите шприцем полоску фага и перенесите ее в силиконированную стеклянную центрифужную пробирку.
3. Добавьте РНКазу (2 мкг/мл) и оставьте при комнатной температуре на 30 мин.
4. Добавьте равный объем ТЭ-буфера (10 мМ трис-HCl, pH 7,5, 1 мМ ЭДТА), чтобы разбавить CsCl. Затем добавьте равный объем фенольной смеси[1] и как следует перемешайте.
5. Отцентрифугируйте 20 мин при 16 000*g* при 8 °С (например, в роторе Sorvall HB4 при 10 000 об/мин).
6. Перенесите водный слой в чистую центрифужную пробирку и повторите фенольную экстракцию.
7. Диализуйте водный слой против нескольких смен ТЭ-буфера.
8. После диализа добавьте 3,0 М ацетат натрия, pH 5,6, до концентрации 0,3 М и два объема этанола. Хорошо перемешайте и оставьте на 1 ч при —70 °С.
9. Отцентрифугируйте 30 мин при 16 000*g* при —10 °С (например, в роторе Sorvall HB4 при 10 000 об/мин).
10. Подсушите осадок фаговой ДНК под вакуумом. Ресуспендируйте осадок в небольшом объеме ТЭ-буфера в концентрации 200—500 мкг/мл и храните при —20 °С.

[1] Состав фенольной смеси см. в сноске 4 к табл. 8.

тифицировать продукты любых генов, клонированных вместе со своими промоторами. Для их экспрессии можно также использовать промотор вектора. Пример такой идентификации продуктов приведен на рис. 4. В стандартной серии проб в качестве матриц использовали ДНК плазмид pBR325 и pLG281 (разд. 2.5.2). Плазмида pLG281 представляет собой плазмиду pBR325, несущую *Eco*RI-фрагмент плазмиды ColIb, кодирующий образование колицина I. В системе Зьюби происходит синтез полипептидов, кодируемых вектором pBR325—CAT и пре-β-лактамазы (β-lac*). Анализ полипептидов приведен на дорожке 4 рис. 4. Обратите внимание, что при этой экспозиции пре-β-лактамаза практически не видна. На дорожке 3 (pLG281 в системе Зьюби) видно, что ген CAT был инактивирован при клонировании; как и ожидалось, видна пре-β-лактамаза, а также новый полипептид с мол. массой ~68 кДа (белок колицин I). На дорожке 2 показан анализ pLG281 в системе экспрессии в мини-клетках *E. coli* DS410 (гл. 6, разд. 3). Как видно, молекулярные массы белка колицина I, синтезированного in vitro (дорожка 3), и белка, синтезированного в условиях, близких к прижизненным (мини-клетки, дорожка 2), совпадают. Это показывает, что колицин I не синтезируется в виде предшественника (разд. 4.3).

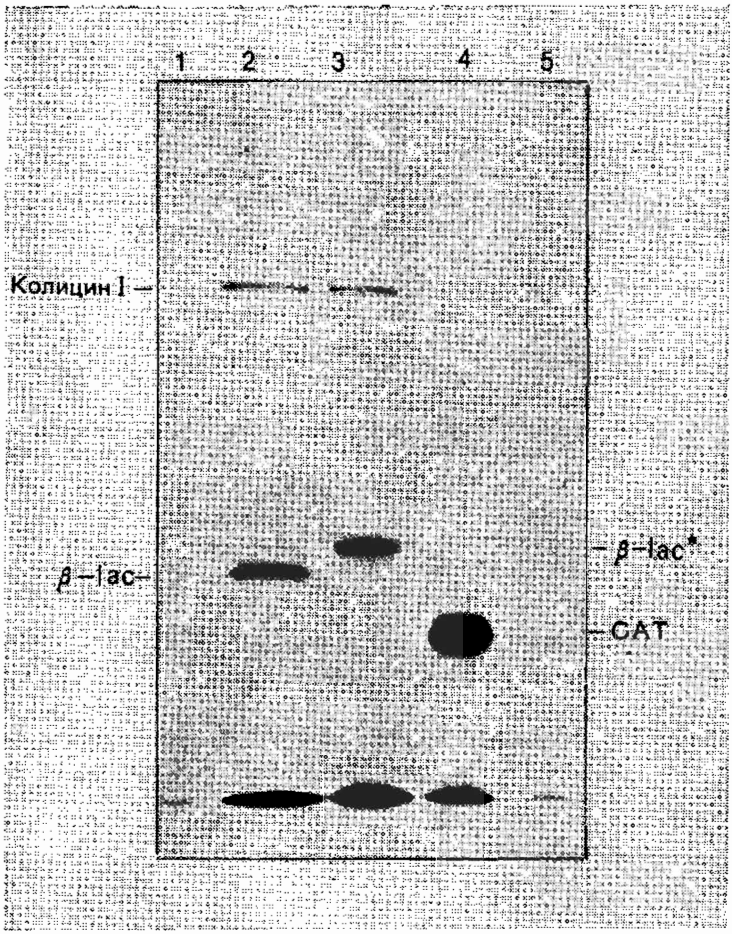


Рис. 4. Идентификация продуктов клонированных генов. Продукты, кодируемые плазмидными генами, метили в мини-клетках *E. coli* DS410 (дорожки 1 и 2; гл. 6) или in vitro в системе Зьюби (дорожки 3—5; настоящая глава, разд. 2) и анализировали с помощью электрофореза в 11%-ном ПААГ—ДСН и радиоавтографии. Дорожка 1 — мини-клетки DS410 (без плазмиды); дорожка 2 — мини-клетки DS410, несущие плазмиду pLG281. Дорожки 3 и 4 — плазмиды pLG281 и pBR325 соответственно в системе Зьюби. Дорожка 5 — контрольная проба системы Зьюби (без ДНК). *Обозначения*: β-lac — β-лактамаза; β-lac* — предшественник β-лактамазы; CAT — хлорамфениколацетилтрансфераза. Все эти белки, включая колицин I, описаны в разд. 4.2. Пре-β-лактамаза имеется и на дорожке 4, но ее трудно увидеть при этой экспозиции.

4.3. Идентификация предшественников белков

Многие мембранные белки синтезируются в виде предшественников с дополнительными гидрофобными участками на N-конце (сигнальными последовательностями). Впоследствии эти участки удаляются при включении белков в мембрану или прохождении через нее [8]. Система синтеза in vitro Зьюби содержит фрагменты мембраны, но они неактивны в качестве акцепторов новосинтезированных мембранных белков. В системе Голда и Швейгера вообще не содержится мембран. Поэтому обе эти системы можно использовать для идентификации предшественников белков. Здесь возможны два подхода. Во-первых, мож-

Таблица 15. Идентификация предшественников белков с помощью фракции мембранных везикул

Выделение мембранных везикул[1]

1. Вырастите 4—6 л культуры клеток в питательном бульоне [2,5% (вес/объем) сухого питательного бульона в воде] до $A_{600}=0{,}5$.
2. Соберите клетки центрифугированием в течение 10 мин при 3000*g* при 4 °С. Промойте клетки, отцентрифугировав их в ледяном буфере А (1 мМ ДТТ, 5 мМ ацетат магния, 50 мМ трис-HCl, pH 7,5).
3. Ресуспендируйте промытые клетки в 40 мл буфера А и разрушьте их во френч-прессе при 210 атм.
4. Отцентрифугируйте разрушенные клетки 10 мин при 10 000*g* при 4 °С.
5. Отберите супернатант и наслоите его порциями по 8 мл на 2 мл 20%-ной (вес/объем) сахарозы в буфере А. Отцентрифугируйте 1 ч при 100 000*g* при 4 °С.
6. Слейте супернатант и ресуспендируйте осадок в небольшом объеме буфера А. Наслоите этот материал поверх двух линейных градиентов сахарозы [20—50% (вес/объем)], приготовленных на буфере А. Отцентрифугируйте в бакет-роторе 20 ч при 180 000*g* при 4 °С.
7. Отберите зону мутного материала в области 35—45% сахарозы и разведите равным объемом буфера А.
8. Отцентрифугируйте 1 ч при 100 000*g* при 4 °С.
9. Ресуспендируйте осадок в буфере Б (1 мМ ДТТ, 10 мМ ЭДТА, 50 мМ трис-HCl, pH 7,5), так чтобы концентрация соответствовала $A_{280}=10$[2].
10. Наслоите материал порциями по 8 мл на 2 мл 20%-ной (вес/объем) сахарозы в буфере А. Отцентрифугируйте 2 ч при 100 000*g* при 4 °С.
11. Ресуспендируйте осадок в буфере А (конечная концентрация соответствует $A_{280}=75$) и храните отдельными порциями при —70 °С.

Использование фракции мембранных везикул

При добавлении фракции мембранных везикул в систему Зьюби наблюдается существенное подавление синтеза белка (в 3—15 раз). Поэтому следует эмпирически подобрать такое количество фракции мембранных везикул, чтобы происходил процессинг белка и достаточно интенсивно шел его синтез. Используйте несколько объемов везикул, от 0,5 до 5 мкл на 30 мкл реакционной смеси. Для уточнения оптимальных условий проанализируйте продукты с помощью электрофореза в ПААГ—ДСН.

[1] По Чангу и др. [11], которые использовали в качестве источника везикул штамм *E. coli* ML30.

[2] Чтобы определить A_{280}, разведите небольшую аликвоту образца в 3%-ном ДСН при 25 °С, перемешайте и измерьте оптическую плотность.

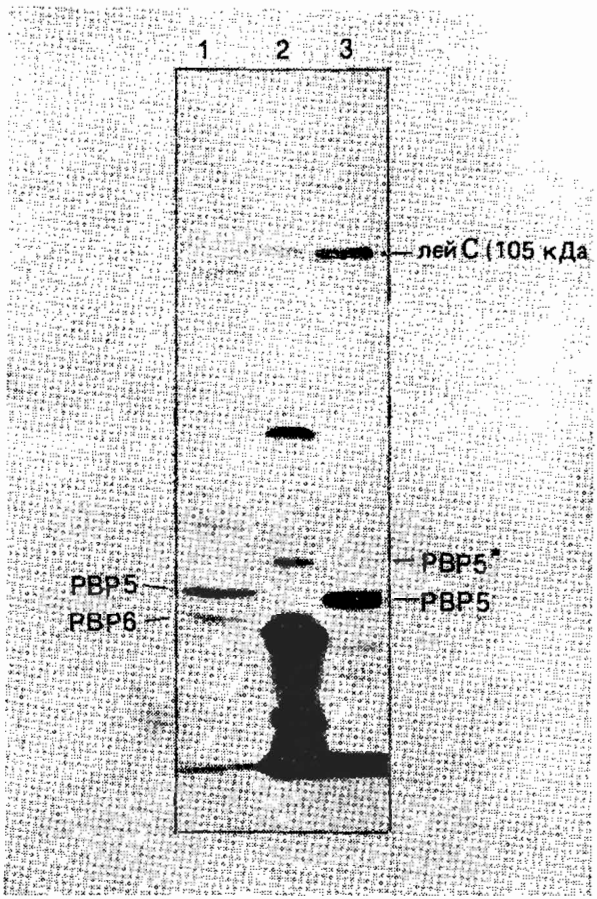


Рис. 5. Идентификация предшественников белков путем сравнения продуктов синтеза in vivo и in vitro. Показана флюорография полипептидов, меченных [^{35}S]-метионином, после электрофореза в 11%-ном ПААГ—ДСН. Дорожка 1 — аутентичные пенициллинсвязывающие белки (PBP), меченные [^{14}C]-бензилпенициллином; дорожка 2 — экспрессия фага λBS10 (фаг λ, несущий гены *pbpA*, *rodA*, *leuS* и *dacA* [8]) в системе Зьюби *in vitro*; дорожка 3 — экспрессия λpBS10 в системе с использованием УФ-облученных клеток-хозяев (гл. 6). При инкубации in vitro экспрессируются не только клонированные гены, но также некоторые гены самого фага λ, поскольку система не содержит репрессорных белков, способных подавить транскрипцию с промоторов фага λ. В системе УФ-облученных клеток-хозяев репрессор имеется и экспрессия фаговых генов подавлена (гл. 6, разд. 2). *Обозначения:* лей С — лейцил-тРНК — синтетаза, PBP5 и PBP6 — пенициллинсвязывающие белки 5 и 6; PBP5* — предшественник PBP5.

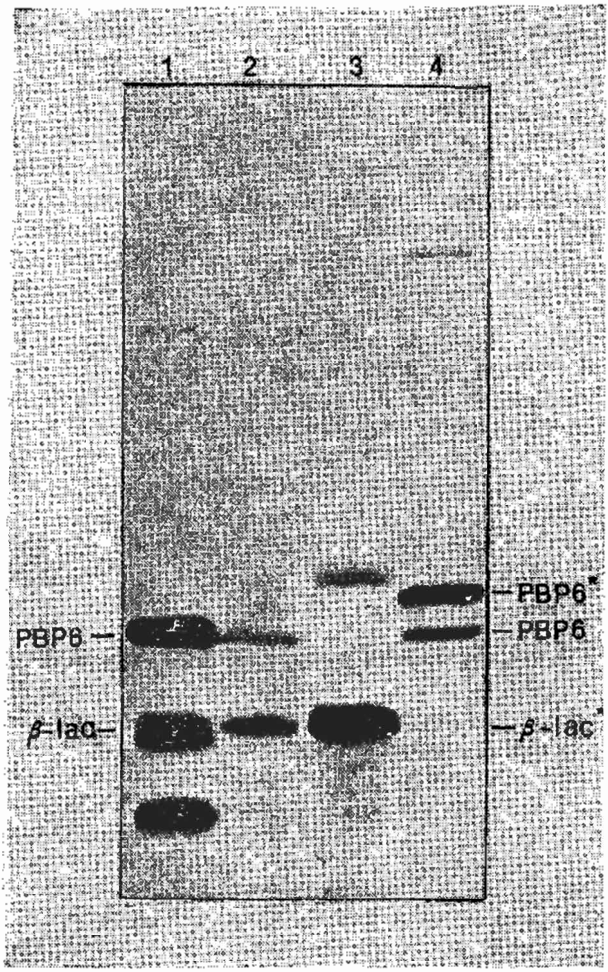


Рис. 6. Идентификация предшественников белков с помощью мембранных везикул. Приведена радиоавтограмма полипептидов, меченных [^{35}S]-метионином, после электрофореза в 11%-ном ПААГ — ДСН. Конструирование плазмиды pLG310 описано в подписи к рис. 9. Дорожка 1 — мини-клетки DS410, несущие плазмиду pLG310; дорожка 3 — экспрессия pLG310 in vitro; дорожка 2 — экспрессия pLG310 in vitro в присутствии вывернутых везикул внутренней мембраны *E. coli*; дорожка 4 — белки PBP, меченные [^{14}C]-бензилпенициллином. Отмечено положение PBP6. *Обозначения* β-lac и PBP6 относятся к β-лактамазе и пенициллинсвязывающему белку 6 соответственно, а β-lac* и PBP6* — к молекулам их предшественников. In vitro синтезируется предшественник PBP6 (дорожка 3), а затем в присутствии фракции мембранных везикул он превращается в зрелый белок (дорожка 2).

но исследовать одну и ту же плазмидную или фаговую ДНК в системе in vitro и в одной из систем экспрессии генов in vivo (см. гл. 6) и сравнить спектры синтезированных полипептидов. Если предшественник существует, он должен быть больше зрелого полипептида и должен выявляться при синтезе in vitro, но не in vivo, когда он процессируется до зрелого полипептида. Можно привести два примера [9, 10]: предшественник β-лактамазы (β-lac*) (ср. дорожки 2 и 3 на рис. 4) и предшественник пенициллинсвязывающего белка 5 (PBP5*) — продукта гена *dacA* (ср. дорожки 2 и 3 на рис. 5). Другой подход заключается в том, чтобы добавить в систему in vitro экзогенные мембранные везикулы, способные акцептировать предшественники полипептидов и процессировать их до зрелых продуктов. При этом сравнение полипептидов, синтезированных in vitro в присутствии и в отсутствие мембранных везикул, позволяет идентифицировать белки, которые синтезируются в виде предшественников. Так был идентифицирован предшественник пенициллинсвязывающего белка 6 (PBP6*) — продукт гена *dacC* [9] (рис. 6). В табл. 15 описаны выделение фракции мембранных везикул и их использование для этой цели.

4.4. Исследование регуляции экспрессии генов

Очевидно, система in vitro особенно удобна для изучения влияния различных компонентов на эффективность экспрессии. Действительно, во множестве работ были получены важные данные такого рода [1]. Однако, поскольку эффективность синтеза белка в сопряженной системе зависит от образования посредника — мРНК, очень важно, чтобы в экстракте практически не было рибонуклеазной активности, которая может заметно влиять на результаты изучения регуляции экспрессии генов. Именно по этой причине в качестве источника S30-экстракта обычно используют штамм MRE600, в котором отсутствует основная рибонуклеазная активность *E. coli*. Вместе с тем активные экстракты были получены и из ряда штаммов, содержащих РНКазы, в том числе из KN126 [5], N138*recB*^{ts} [12] и LE316 [5], в которых эндогенная РНКазная активность *E. coli* сравнительно низка, по крайней мере в условиях реакции. Вероятно, активный экстракт можно получить из любого мутантного штамма *E. coli*. Затем этот экстракт можно использовать в качестве тест-системы для очистки тех компонентов фракционированного экстракта клеток дикого типа, которые восстанавливают активность транскрипции или трансляции. В обзоре Зьюби [1] подробно рассмотрено использование сопряженных систем транскрипции — трансляции для изучения регуляции экспрессии генов.

5. Использование линейных ДНК в качестве матриц

5.1. Экспериментальный подход

Все приведенные выше примеры транскрипции и трансляции основаны на использовании в качестве матриц плазмидных или фаговых ДНК. Плазмидную ДНК вносят в инкубационную смесь в нативной конформации — в виде ковалентно-замкнутых кольцевых молекул, большей частью отрицательно сверхспирализованных. Вместе с тем ДНК фага λ, имеющая линейную форму, служит хорошей матрицей для транскрипции. Поэтому казалось возможным, что фрагменты ДНК, образованные при расщеплении эндонуклеазами рестрикции, также должны быть хорошими матрицами для транскрипции. Однако попытки использовать небольшие линейные ДНК в системах транскрипции — трансляции in vitro имели лишь ограниченный успех. Чем короче фрагмент ДНК, тем труднее получить сколько-нибудь осмысленные результаты. Изучение стабильности ДНК-матрицы в обычных условиях инкубации по критерию растворимости в ТХУ показало, что кольцевая плазмидная ДНК весьма стабильна (менее 5% деградации), ДНК фага λ деградирует примерно на 30%, а сильнее всего деградируют линеаризованные молекулы плазмидной ДНК [13]. Причиной деградации линейных матриц служит экзонуклеазная активность, присутствующая в экстрактах *E. coli*. Неожиданно высокая стабильность ДНК фага λ объясняется ее способностью замыкаться в кольцо во время инкубации посредством длинных липких концов, что делает ДНК устойчивой к действию экзонуклеаз. Линейные фрагменты ДНК (даже линеаризованные плазмиды с короткими липкими концами) не превращаются обратно в кольцо в условиях инкубации и потому быстро деградируют. Но даже в этом случае на коротких фрагментах линейной ДНК в качестве матриц удается получить полные полипептидные продукты, если использовать большие количества ДНК (не менее 5 мкг на пробу) [5]. Это дает возможность небольшой части молекул ДНК транскрибироваться до того, как они деградируют. Однако за такое же время инкубации гены со слабыми промоторами будут транскрибироваться очень слабо, и поэтому их продукты не удается идентифицировать, даже пользуясь этим приемом. К счастью, оба метода получения систем транскрипции — трансляции, описанные в настоящей главе, можно модифицировать так, чтобы стало возможным эффективное использование линейной ДНК любого размера.

5.1.1. Система Зьюби

Основным источником экзонуклеазной активности в клетках *E. coli* является экзонуклеаза V — продукт генов *recB* и *recC*.

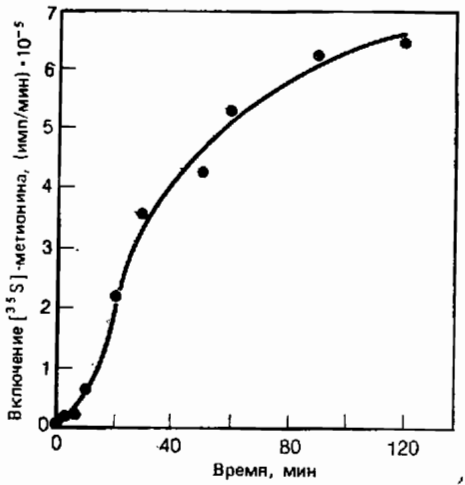


Рис. 7. Синтез белка на матрице линейной ДНК в присутствии экстракта, свободного от экзонуклеазы V. Синтез проводили на матрице ДНК pBR325, расщепленной *Hind*III, в присутствии S30-экстракта из клеток N138*recB*^{ts}. Через различные промежутки времени инкубации отбирали пробы объемом 2 мкл и определяли включение радиоактивности в белок в ТХУ-нерастворимой фракции (табл. 10).

Мутация в любом из этих локусов приводит к инактивации экзонуклеазы V [14]. В S30-экстракте, полученном из штамма *recB*, линейная ДНК сохраняется в течение по крайней мере 2 ч, однако в этом экстракте наблюдается высокий уровень синтеза белка в отсутствие добавленной ДНК, так как он содержит большое количество загрязняющих фрагментов хромосомной ДНК [12, 13]. Метод Зьюби включает две стадии, на которых происходит удаление хромосомной ДНК; вначале два центрифугирования при 30 000 *g* (разд. 2.4, стадии 9 и 10) приводят к осаждению крупных фрагментов ДНК; затем предынкубация в течение 80 мин при 37 °С (раздел 2.4, стадия 11) в присутствии АТР вызывает деградацию оставшихся хромосомных фрагментов. Для второй процедуры необходима активная экзонуклеаза V. Поэтому можно использовать температурочувствительный штамм *recB* (N138*recB*^{ts}) и готовить экстракт при пермиссивной температуре 30 °С. Для полной деградации хромосомных фрагментов приходится увеличить время предынкубации до 160 мин (разд. 2.4, стадия 11). В условиях инкубации, которые используются для транскрипции и трансляции in vitro (37 °С, непермиссивная температура), экзонуклеаза V неактивна, и экзогенная линейная ДНК выдерживает в этом экстракте 2 ч, тогда как в экстракте *recB*$^{+}$-клеток — 5—10 мин. Синтез с линейных матриц идет в таком экстракте около 100 мин (рис. 7).

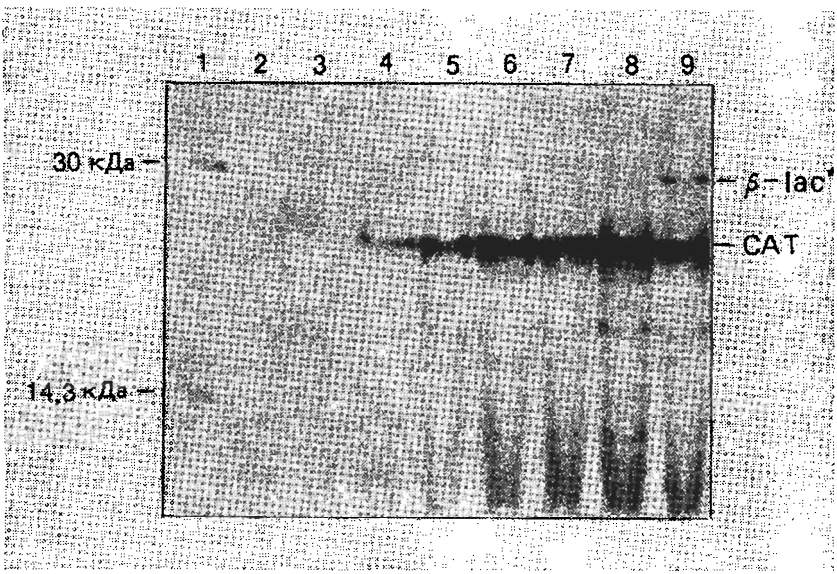


Рис. 8. Зависимость синтеза белка от концентрации ДНК при использовании в качестве матрицы линейной ДНК. Радиоавтография геля после электрофореза полипептидов, меченных [^{35}S]-метионином, которые были синтезированы в присутствии различных количеств ДНК pBR325, линеаризованной рестриктазой *Pst*I, в качестве матрицы и S30-экстракта из клеток N138*recB*^{ts}. Электрофорез проводили в 15%-ном ПААГ — ДСН. Дорожка 1 — белки — маркеры молекулярной массы; дорожка 2 — проба без ДНК; дорожки 3—8 соответственно 50 нг, 375 нг, 0,75 мкг, 1,5 мкг, 3 мкг, 5 мкг ДНК pBR325, расщепленной *Pst*I. Дорожка 9 — 2,5 мкг сверхспиральной ДНК pBR325. Пре-β-лактамаза (пре-β*) видна только на дорожке 9, так как во всех других пробах соответствующий ген инактивирован в результате расщепления рестриктазой *Pst*I. *Pst*I не затрагивает ген CAT.

Отметим также, что фон низок (рис. 8, дорожка 2), и для получения достоверных результатов достаточно всего 50 нг ДНК (рис. 8, дорожка 3), тогда как для системы с S30-экстрактом из клеток *recB*$^+$ требуется 2—5 мкг ДНК [12].

5.1.2. Система Голда и Швейгера

В методе Голда и Швейгера (разд. 3) нет проблемы загрязнения фрагментами хромосомной ДНК при использовании штаммов *recB*, так как все фрагменты ДНК удаляются на стадии хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. Многие исследователи с успехом использовали экстракты, полученные этим способом из штаммов *recB*, для изучения белков, кодируемых определенными рестриктными фрагментами [13].

5.2. Значение сверхспирализации

При трактовке результатов, получаемых с линейной ДНК в качестве матрицы, следует помнить о том, что in vivo ДНК может быть в сверхспиральном состоянии и это может менять эффективность экспрессии некоторых генов. Это особенно важно, когда изучают факторы, регулирующие экспрессию генов. В ряде работ с использованием очищенных систем транскрипции было показано, что в качестве матрицы для транскрипции отрицательно сверхспирализованная ДНК более эффективна, чем релаксированная форма той же молекулы [15]. Из структурных соображений очевидно, что отрицательные сверхвитки благоприятствуют раскручиванию двойной спирали. Поскольку полагают, что для образования комплекса инициации между РНК-полимеразой и промотором необходимо хотя бы частичное расплетание двойной спирали, наблюдаемая стимуляция транскрипции под действием сверхспирализации, возможно, связана со снижением энергии активации, необходимой для образования комплекса инициации. Сверхспирализация может усиливать транскрипцию двумя путями: увеличивая частоту инициации на работающих промоторах и делая доступными для транскрипции новые участки инициации. Было показано, что такая стимуляция транскрипции специфична к определенным промоторам и уровень ее сильно колеблется. Кроме того, очевидно, что уровень стимуляции зависит от ряда условий, в том числе температуры, ионной силы и соотношения полимеразы и ДНК [16]. За введение отрицательных сверхвитков в кольцевые молекулы ДНК ответствен фермент ДНК-гираза [17]. Он состоит из двух субъединиц — продуктов генов *gyrA* и *gyrB*. S30-экстракт содержит значительную активность гиразы, и релаксированные ковалентно-замкнутые ДНК при инкубации в этом экстракте быстро подвергаются сверхспирализации. Раскручивание ДНК для удаления сверхвитков осуществляет фермент топоизомераза I [17], но его активность низка по сравнению с активностью гиразы. Во время инкубации в S30-экстракте кольцевые молекулы ДНК находятся в сверхспиральной форме, тогда как линейные ДНК не могут быть сверхспиральными. Если сверхспирализация необходима для эффективной инициации транскрипции на некоторых промоторах, то этот фактор может оказаться лимитирующим при использовании линейных фрагментов ДНК в качестве матриц в системах in vitro: можно не найти гены, промоторы которых нуждаются в сверхспирализации для экспрессии, а исследования регуляции экспрессии генов in vitro могут не иметь никакого отношения к ситуации in vivo.

Один из способов изучения вклада сверхспирализации в эффективность транскрипции состоит в сравнении экспрессии

сверхспиральной и релаксированной ковалентно-замкнутой форм одной и той же молекулы. При инкубации в присутствии S30-экстракта релаксированные плазмидные ДНК быстро сверхспирализуются, но эту сверхспирализацию можно подавить одним из специфических ингибиторов гиразы [15]. С помощью этого подхода Янг и др. [15] продемонстрировали существенное снижение экспрессии ряда генов, в том числе генов, кодирующих колицин E1 и β-галактозидазу в отсутствие сверхспирализации. Подобные эксперименты были проведены и с использованием S30-экстракта, полученного из мутантных по ДНК-гиразе клеток [5]. Релаксированную и сверхспиральную формы плазмиды ColE1 инкубировали по отдельности в присутствии экстракта и затем проверяли, какие топологические изменения возникали в ДНК. ДНК оставалась в этих случаях полностью релаксированной и полностью сверхспиральной соответственно. Анализ продуктов генов ясно показал, что, в противоречии с данными Янга и др. [15], конформация ДНК не оказывает никакого избирательного действия на экспрессию каких-либо генов плазмиды ColE1. Анализ релаксированной и сверхспиральной форм плазмиды pBR325 в S30-экстракте из клеток, мутантных по гиразе, свидетельствует о том, что в отсутствие сверхспирализации происходит экспрессия всех кодируемых плазмидой белков, а синтез β-лактамазы идет в присутствии релаксированной матрицы даже более эффективно.

Таким образом, роль сверхспирализации в экспрессии генов остается совершенно неясной, и прежде чем сделать окончательные выводы, необходимы дополнительные исследования. Мы считаем, что сверхспирализация не обязательна для экспрессии в системах in vitro всех генов, кодируемых матрицей, и поэтому линейные фрагменты ДНК способны функционировать как матрицы. Можно ли использовать линейные ДНК при изучении факторов, участвующих в регуляции экспрессии генов, — вопрос спорный. В данном случае больше подходят кольцевые сверхспиральные матрицы, так как они лучше воспроизводят топологию ДНК in vivo.

5.3. Идентификация химерных белков

При клонировании фрагментов ДНК в плазмидных или фаговых векторах в результате соединения кодирующих последовательностей вектора и вставки могут возникать матрицы для химерных белков. Появление таких белков на электрофореграмме при анализе рекомбинантных ДНК в какой-либо из систем экспрессии генов in vivo (гл. 6) затрудняет интерпретацию результатов. Эту проблему можно решить с помощью системы экспрессии in vitro. Перед инкубацией ДНК расщепляют эндонуклеаза-

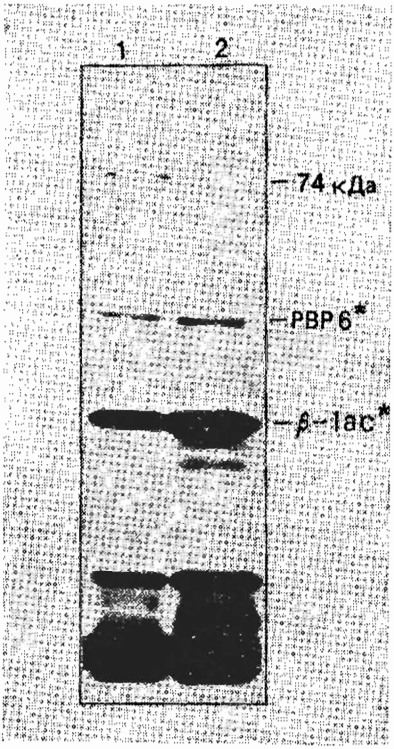


Рис. 9. Идентификация химерных белков. Радиоавтография полипептидов, меченных [^{35}S]-метионином, после электрофореза в 11%-ном ПААГ—ДСН. Полипептиды синтезировали in vitro в присутствии S30-экстракта из клеток MRE600. Дорожка 1 — 5 мкг pLG310; дорожка 2 — 5 мкг pLG310 после расщепления *Eco*RI. Плазмида pLG310 была получена путем лигирования *Eco*RI-фрагмента (6,4 kb), несущего *dacC* (структурный ген PBP6), с вектором pSF2124 (ColE1::Tn*3*). Ни pSF2124, ни *Eco*RI-фрагмент по отдельности не кодируют белок с мол. массой 74 кДа. Этот белок образуется путем непрерывного считывания через границу вектора и вставки; поэтому его синтез чувствителен к расщеплению *Eco*RI. PBP6* и β-lac* — предшественники пенициллинсвязывающего белка 6 и β-лактамазы соответственно.

ми рестрикции, использованными для клонирования. При сравнении полипептидов после электрофореза в ПААГ—ДСН с набором белков, образующихся при экспрессии интактной ДНК [5], подвижность химерных белков всегда меняется при расщеплении ДНК (рис. 9).

5.4. Идентификация продуктов клонированных генов, сходных по размеру с белками, кодируемыми вектором

Большинство белков, кодируемых плазмидными векторами для клонирования, имеют мол. массу менее 35 кДа. Поэтому более крупные белки, кодируемые клонированной ДНК, легко идентифицировать, но меньшие белки могут быть замаскированы векторными белками со сходной молекулярной массой. На рис. 10 приведен анализ одного из плазмидных векторов и его рекомбинантного производного, для которых спектры белков весьма сходны. Чтобы идентифицировать кодируемый вставкой полипептид, рекомбинантную плазмиду расщепили рестрик-

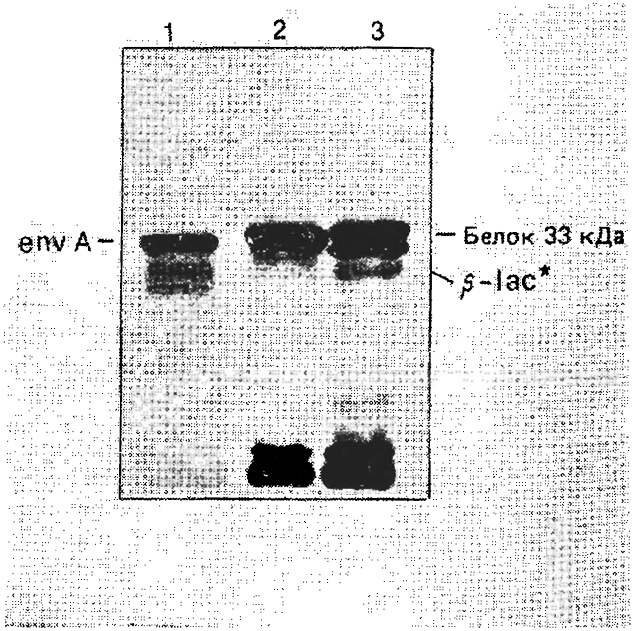


Рис. 10. Идентификация продуктов клонированных генов, идентичных по размеру белкам, кодируемым вектором. Приведена радиоавтография полипептидов, меченных [^{35}S]-метионином, после электрофореза в 15%-ной ПААГ — ДСН. Синтез проводили в присутствии экстракта клеток *E. coli* MRE600. Плазмида pKN410 — вектор, pLG510 — его рекомбинантное производное, содержащее *Eco*RI-фрагмент длиной 2,5 kb. Дорожка 1 — *Eco*RI-фрагмент pLG510, дорожка 2 — pLG510, дорожка 3 — pKN410. Белок с мол. массой 33 кДа и неизвестной функцией кодируется вектором, и его ген содержит *Eco*RI-сайт; β-lac* — предшественник β-лактамазы.

тазой *Eco*RI и клонированный фрагмент очистили с помощью электрофореза в агарозном геле. Когда его ввели в качестве матрицы в систему Зьюби, он детерминировал синтез одного белка с массой 32 кДа (рис. 10, дорожка 1). Этот белок был позднее идентифицирован как продукт гена *envA*. Белок с мол. массой 33 кДа (рис. 10, дорожка 3) — полипептид, который кодируется вектором pKN410, содержащим *Eco*RI-сайт, и поэтому его нет среди продуктов, синтезированных на матрице рекомбинантной ДНК, но на его место попадает белок с мол. массой 32 кДа, кодируемый вставкой. Из-за этого возникла сложность в идентификации полипептидов, кодируемых клонированной ДНК, пока ее не выделили и не использовали как матрицу в отсутствие векторной ДНК.

5.5. Идентификация генов, клонированных со своими собственными промоторами

Поскольку в системе транскрипции — трансляции in vitro, модифицированной для использования линейных ДНК-матриц (разд. 5.1), можно анализировать ДНК вектора и вставки по отдельности, легко установить, клонирован ли тот или иной ген вместе со своим промотором (рис. 10). Если цель эксперимента — изучение регуляции экспрессии гена, то использование клонированным геном своего собственного промотора особенно важно. Ведь во многих экспериментах по клонированию инициация транскрипции происходит частично, а то и полностью, на одном из векторных промоторов.

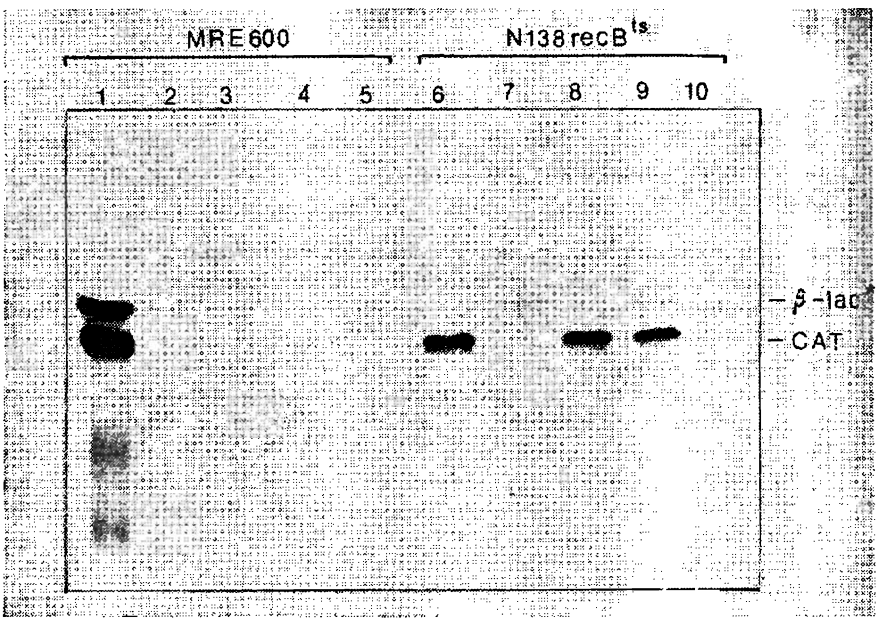


Рис. 11. Идентификация внутригенных и межгенных сайтов узнавания эндонуклеазами рестрикции. Радиоавтография полипептидов, меченных [^{35}S]-метионином, после электрофореза в 15%-ном ПААГ—ДСН. Полипептиды синтезировали в присутствии S30-экстракта из клеток *E. coli* MRE600 или N138*recB*^{ts}. Матрицей служила плазмида pBR325, расщепленная различными эндонуклеазами рестрикции. Дорожки 1 и 6 — pBR325; дорожки 2 и 7 — pBR325, расщепленная *Eco*RI; дорожки 3 и 8 — pBR325, расщепленная *Pst*I; дорожки 4 и 9 — pBR325, расщепленная *Hind*III; дорожки 5 и 9 — контрольные пробы без ДНК. *Обозначения:* β-lac* и CAT — предшественники β-лактамазы и хлорамфениколацетилтрансфераза соответственно.

5.6. Идентификация сайтов рестрикции внутри генов и между генами

Модифицированные системы транскрипции — трансляции in vitro (разд. 5.1) позволяют легко идентифицировать сайты рестрикции внутри генов и между генами. Для этого достаточно обработать ДНК различными рестриктазами и проанализировать, на синтез каких полипептидов эта обработка не влияет, а синтез каких чувствителен к расщеплению ДНК той или иной эндонуклеазой рестрикции. Это позволяет картировать определенные полипептидные продукты с точностью до очень коротких фрагментов ДНК. На рис. 11 приведены результаты использования pBR325, расщепленной различными ферментами рестрикции, в качестве матрицы для транскрипции — трансляции in vitro. Синтез CAT чувствителен к расщеплению *Eco*RI (дорожка 7), а синтез β-лактамазы чувствителен к расщеплению *Pst*I (дорожка 8). Белок устойчивости к тетрациклину в этих пробах не найден. На этом же рисунке приводится сравнение экстрактов из клеток *recB*$^+$ и *recB*^{ts} и видно, что *recB*^{ts}-экстракт гораздо эффективнее в присутствии линеаризованной ДНК.

5.7. Анализ ДНК в гетерологичных системах

Мы исследовали ДНК грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus* в S30-экстрактах, полученных из *E. coli* [5]. Эта ДНК весьма эффективно функционировала в системе транскрипции — трансляции с образованием ряда полипептидных продуктов. Однако число обнаруженных полипептидов превышало их количество, вычисленное на основании анализа последовательности ДНК [18]. Ту же плазмиду анализировали в штамме *Bacillus subtilis* — продуценте мини-клеток (*B. subtilis* — также грамположительная бактерия), и при этом синтезировалось гораздо меньше белков, чем в опытах in vitro [19, 20]. Вполне возможно, что на гетерологичной ДНК ДНК-зависимая РНК-полимераза *E. coli* способна инициировать транскрипцию на участках, которые в норме не используются. Поэтому результаты, полученные на гетерологичных ДНК, следует интерпретировать с крайней осторожностью. Возможно, эту проблему удастся решить, когда будут ставить эксперименты на подобных системах транскрипции — трансляции из других видов бактерий. Такие системы уже получены из *B. subtilis* [21] и *Streptomyces lividans* (Rae, Cundliffe, личное сообщение).

5.8. Экспрессия эукариотических генов

Для того чтобы получить экспрессию эукариотического гена в *E. coli*, он должен либо не иметь интронов, либо должен быть клонирован в виде кДНК; кроме того, его необходимо снабдить

прокариотическими сигналами экспрессии. Однако из-за различий в использовании кодонов между прокариотами и эукариотами экспрессия в *E. coli* может оказаться неэффективной. В системах in vitro эту проблему можно решить, если изменить набор тРНК в реакционной смеси.

6. Сравнение систем транскрипции — трансляции in vitro

6.1. Достоинства и недостатки модифицированной системы Зьюби

6.1.1. Достоинства

1. Систему несложно получить и очень легко использовать.
2. S30-экстракт — неочищенный препарат, и в нем должно присутствовать большинство регуляторных факторов.
3. S30-экстракт можно хранить в жидком азоте несколько лет без всякой потери активности.

6.1.2. Недостатки

1. S30-экстракт может содержать остатки ДНК, которые способны служить матрицами и давать большое число фоновых полипептидов. Правда, обычно остаточное содержание ДНК ничтожно.
2. S30-экстракт содержит фрагменты мембран, хотя и не активных как акцепторы при биосинтезе мембранных белков [9].

6.2. Достоинства и недостатки системы Голда и Швейгера

6.2.1. Достоинства

1. Фракционирование на ДЭАЭ-целлюлозе обеспечивает почти полное освобождение системы от остатков ДНК, в результате чего система имеет крайне низкое фоновое включение.
2. Система Голда и Швейгера содержит, по-видимому, меньше эндогенных аминокислот, чем система Зьюби, что дает более высокое включение радиоактивных аминокислот.

6.2.2. Недостатки

1. Систему сложно получать и использовать.
2. Белковая фракция и рибосомы стабильны лишь в течение нескольких месяцев.
3. В ходе приготовления системы при хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе могут быть утрачены некоторые важные белковые факторы.

7. Преимущества системы in vitro по сравнению с системами in vivo

Системы транскрипции — трансляции in vitro имеют ряд преимуществ перед системами in vivo (гл. 6).

1. Можно использовать в качестве матриц линейные фрагменты ДНК (разд. 5).

2. Легко можно исследовать факторы, регулирующие экспрессию генов [22].

3. Можно изучать сборку и процессинг мембранных белков, добавляя фракцию мембранных везикул [9].

4. In vitro легче идентифицировать белки, чувствительные к деградации клеточными протеазами, чем in vivo. Нам удалось идентифицировать in vitro неполные (оборванные) полипептиды и мембранные белки с нарушенной компартментацией, которые не обнаруживались in vivo (Pratt, неопубликованные данные).

5. В системе in vitro можно получать большие количества белков, которые очень слабо синтезируются in vivo из-за действия репрессоров, кодируемых клетками-хозяевами [4].

6. Включение меченых аминокислот весьма эффективно благодаря низкому содержанию эндогенных аминокислот в экстракте.

Другие аспекты сравнения систем in vitro и in vivo обсуждаются в гл. 6, табл. 1.

8. Возможные проблемы при использовании систем in vitro

Хотя системы транскрипции — трансляции in vitro, описанные в настоящей главе, обладают определенными преимуществами перед системами экспрессии генов in vivo (гл. 6), они имеют и ряд недостатков, которые вкратце изложены ниже.

1. Синтез крупных белков (с молекулярной массой, превышающей 70 кДа) может быть не очень эффективным из-за преждевременной терминации трансляции данных белков. Это легко обнаружить по характерному виду геля после электрофореза, в результате которого полосы располагаются в виде «лесенки». Иногда эту трудность можно преодолеть, сократив время инкубации (например, до 15 мин).

2. Полипептиды, синтез которых не закончился во время инкубации, могут быть удалены в процессе центрифугирования проб при 5000 g в течение 2 мин. При этом осаждаются новообразованные полипептиды, связанные с полисомами, и спектр белков в геле меньше напоминает «лесенку». Этот прием иногда облегчает выявление белков с низкой молекулярной массой.

3. Артефакты в системах in vitro — вещь обычная. Поэтому все эксперименты следует по возможности проводить параллельно in vivo и in vitro; в противном случае интерпретировать результаты следует с известной осторожностью.

4. В опытах in vitro в качестве меченой аминокислоты обычно используют [^{35}S]-метионин; однако следует иметь в виду, что не все белки содержат метионин, а S30-экстракт обладает способностью частично удалять N-формилметионин [23]. Следовательно, чтобы уверенно идентифицировать все белки, необходимо использовать в параллельных экспериментах какую-нибудь другую аминокислоту, например [^{14}C]-лейцин.

5. При исследовании генов, клонированных в фаге λ, в системе in vitro два промотора λ, P_L и P_R, будут обусловливать транскрипцию фаговых генов наряду с клонированными генами. В системе *in vivo* с использованием УФ-облученных клеток-хозяев (гл. 6, разд. 2) экспрессию генов фага λ можно подавить λ-репрессором. Поэтому набор белков, полученный при инкубации in vitro, может оказаться гораздо сложнее, чем набор in vivo. Возможно, эту проблему можно решить, если получить S30-экстракт из лизогенного штамма, но результат будет зависеть от стабильности репрессора в условиях получения системы и ее хранения. Другая возможность состоит в добавлении очищенного репрессора в инкубационную смесь перед добавлением ДНК фага λ. Ни один из этих подходов пока не был использован.

Благодарности

Выражаю благодарность за предоставление мне субсидии Совета по медицинским исследованиям № G8203714CB.

Литература

1. *Zubay G.* Annu. Rev. Genet., **7**, 267 (1973).
2. *DeVries J. K., Zubay G.* J. Bacteriol., **97**, 1419 (1969).
3. *Gold L. M., Schweiger M.* In: Methods in Enzymology, vol. 20, Moldave K. and Grossman L. (eds.), Academic Press Inc., London and New York, p. 537, 1971.
4. *Collins J.* Gene, **6**, 29 (1979).
5. *Pratt J. M., Boulnois G. J., Darby V., Orr E., Wahle E., Holland I. B.* Nucleic Acid Res., **9**, 4459 (1981).
6. *O'Farrell P. Z., Gold L. M.* J. Biol. Chem., **248**, 5512 (1973).
7. *Konings R. N. H.* In: Methods in Enzymology, vol. 20, Moldave K. and Grossman L. (eds.), Academic Press Inc., London and New York, p. 537, 1980.
8. *Blobel G., Dobberstein B.* J. Cell Biol., **67**, 835 (1975).
9. *Pratt J. M., Holland I. B., Spratt B. G.* Nature, **293**, 307 (1981).
10. *Sutcliffe J. G.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 3737 (1978).

11. *Chang C. N., Model P., Blobel G.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 1251 (1979).
12. *Jackson M., Pratt J. M., Holland I. B.* FEBS Lett., **163**, 221 (1983).
13. *Yang H., Ivashkiv L., Chen H., Zubay G., Cashel M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 7029 (1980).
14. *Tomizawa J., Ogawa H.* Nature New Biol., **239**, 14 (1972).
15. *Yang H., Heller K., Gellert M., Zubay G.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 3304 (1979).
16. *Seeburg P. H., Nüsslein C., Schaller H.* Eur. J. Biochem., **74**, 107 (1977).
17. *Gellert M.* Annu. Rev. Biochem., **50**, 879 (1981).
18. *Horinouchi S., Weisblum B.* J. Bacteriol., **150**, 815 (1982).
19. *Shivakumar J. H., Dubnau D.* Plasmid, **2**, 279 (1979).
20. *Shaw W. V.* CRC Crit. Rev. Biochem., **14**, 1 (1983).
21. *Leventhal J. M., Chambliss G. H.* Biochim. Biophys. Acta, **564**, 162 (1979).
22. *De Crombrugghe B., Pastan I., Shaw W. V., Rosner J. L.* Nature New Biol., **241**, 237 (1973).
23. *Jerez C., Weissbach H.* J. Biol. Chem., **255**, 8706 (1980).

ВЫДЕЛЕНИЕ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ МАТРИЧНОЙ РНК (мРНК)

М. Клеменс

1. Введение

В течение последнего десятилетия выделение мРНК и ее трансляция in vitro стали использоваться особенно широко. Подобные работы заложили основу для развития технологии рекомбинантной ДНК, с помощью которой в настоящее время удается получать много ценной информации в области биологии и медицины. Кроме того, изучение отдельных мРНК, выделенных в чистом виде, и их продуктов трансляции внесло важный вклад в понимание регуляции экспрессии генов в клетке на различных уровнях. Все это стало возможным благодаря разработке методов получения недеградированных биологически активных мРНК из самых разнообразных источников. В настоящей главе описаны методы выделения мРНК из эукариотических клеток. Выделение мРНК из бактерий не рассматривается, оно было описано в ряде более ранних обзоров [1, 2]. К тому же во многих случаях нужда в выделении такой мРНК отпала, так как были разработаны системы сопряженной транскрипции — трансляции (гл. 7).

2. Выделение и очистка матричной РНК

Поскольку эукариотические мРНК выделяют из множества различных клеток и тканей, в литературе описано много различных методик. Они обладают определенными общими чертами, и к ним предъявляется ряд общих требований. Перечислим основные из них:

1. Необходимо как можно полнее отделять РНК от белка, а в некоторых случаях и от ДНК.

2. Чтобы получать интактную и, следовательно, биологически активную мРНК, необходимо подавлять рибонуклеазную активность как во время выделения РНК, так и впоследствии.

3. Многие методики включают отделение определенных видов мРНК от других мРНК и от РНК других классов.

Выбор тех или иных методик диктуется характером предпринимаемых исследований и свойствами используемого биологического материала.

2.1. Оборудование и растворы

Исследователи, занимающиеся выделением мРНК, должны проводить эксперименты крайне тщательно, чтобы избежать рибонуклеазного загрязнения образцов. Рибонуклеазы — очень активные ферменты, и достаточно ничтожного их количества, чтобы инактивировать мРНК. Как преодолеть трудности, связанные с эндогенной рибонуклеазной активностью биологического материала, описано ниже, в разд. 2.7. Чтобы избежать рибонуклеазного загрязнения из посторонних источников, необходима соответствующая организация лабораторной работы. Основные требования перечислены в табл. 1 и более подробно описаны ниже.

Таблица 1. Предосторожности против рибонуклеазного загрязнения при выделении мРНК[1]

Прокалите или проавтоклавируйте стеклянную посуду; проавтоклавируйте пластиковую посуду.
Для приготовления растворов используйте автоклавированную воду.
Используйте реактивы максимальной имеющейся чистоты.
Обрабатывайте все растворы для инактивации рибонуклеаз 0,2%-ным (конечная концентрация) ДЭПК; стерилизуйте их фильтрованием для удаления микроорганизмов.
Добавляйте в растворы ингибиторы рибонуклеаз (разд. 2.7), если это возможно.
Пользуйтесь пластиковыми или резиновыми перчатками
Оберегайте растворы и препараты РНК от пыли, прикосновения пальцев и т. п.

[1] Подробнее см. в тексте.

2.1.1. Стеклянная и пластиковая посуда

Вся необходимая стеклянная и стерильная пластиковая посуда должна быть приготовлена заранее (желательно с некоторым запасом), а необходимую нестерильную посуду и оборудование следует обработать в сухожаровом шкафу (4 ч при 160 °С) или в автоклаве (~1 атм, 15 мин). Предварительно проверьте, какую максимальную температуру выдерживает пластиковое оборудование. Для работы с растворами РНК используйте по возможности стерильные пробирки одноразового использования.

2.1.2. Растворы

Растворы следует готовить из реактивов высшей доступной чистоты на дважды автоклавированной дистиллированной в стеклянном аппарате воде. Многие специализированные фир-

Таблица 2. Фирмы — производители реактивов для выделения мРНК

Особо чистые реактивы	
Бычий сывороточный альбумин (свободный от рибонуклеаз)	BRL, Enzo Biochem. Inc.
ДТТ	BRL, CBL
ЭДТА	CBL
Формамид	BRL
Гуанидинийхлорид	»
Гуанидинийтиоцианат	Fluka AG
Nonidet P-40	BRL, Sigma
Фенол	BRL
ДСН	BRL, CBL
Сахароза (свободная от рибонуклеаз)	BRL, CBL
Тритон X-100	CBL
Мочевина	BRL, CBL
Аффинные сорбенты	
Oligo(dT)-целлюлоза	BRL, Collaborative Research Sigma
Poly(U)-сефароза	BRL, Pharmacia, Sigma
Ингибиторы рибонуклеаз	
Гепарин	Sigma
Ингибитор рибонуклеаз из плаценты человека	BRL, Enzo Biochem. Inc., Sigma, P-S Biochemicals
Ванадилрибонуклеозидный комплекс	BRL

мы продают особо чистые реактивы, свободные от примеси рибонуклеаз, например сахарозу (табл. 2). Лучше всего стерилизовать растворы сразу после приготовления, пропуская их через мембранный фильтр (размер пор 0,22 мкм) или автоклавируя. Остаточное рибонуклеазное загрязнение можно полностью удалить с помощью обработки растворов 0,2%-ным (конечная концентрация) ДЭПК [3] в течение 12 ч; но прежде чем использовать эти растворы, следует удалить ДЭПК прогреванием (100 °С, 15 мин), поскольку он может реагировать с нуклеиновыми кислотами. ДЭПК нельзя использовать для обработки растворов, содержащих трис-буферы, так как он реагирует с первичными аминами.

Фенол, часто используемый для выделения мРНК, также должен быть насколько возможно чистым. Его легко перегнать под тягой, поддерживая необходимую температуру колбонагревателя (160 °С) и используя холодильник с воздушным охлаждением для сбора перегнанного жидкого фенола. Во время этой процедуры соблюдайте строгие меры предосторожности (в частности, одевайте защитные очки). Жидкий дистиллят собирайте в стерильную воду и храните при —20 °С в виде водонасыщенного раствора. Используйте для перегонки достаточно чистый

фенол и прекратите перегонку, когда в перегнанной колбе еще остается некоторое количество жидкости, чтобы снизить опасность взрыва. Фенол не должен попадать на кожу, так как он может вызвать серьезные ожоги, которые потребуют срочных мер первой помощи. При работе с РНК всегда надевайте пластиковые перчатки; во-первых, чтобы защитить руки от фенола и, во-вторых, чтобы рибонуклеазы кожи не попали в растворы.

2.2. Выбор метода выделения РНК

Описано множество методик выделения РНК из животных и растительных клеток и тканей. Выбор определенной методики зависит от конкретных задач эксперимента и от свойств исходного биологического материала. Прежде всего следует решить, выделять ли РНК из целых клеток или из какой-либо субклеточной фракции (скажем, из ядра, цитоплазмы, полисом или пострибосомного супернатанта). В следующем разделе описаны методы выделения РНК из гомогенатов целых клеток (или тканей) и цитоплазматических фракций. В разд. 2.4 рассмотрены особые методы получения РНК из суммарной фракции полисом или отдельных субфракций этих органелл. Выбор методики определяется задачами исследования. Некоторые аспекты этой проблемы обсуждаются в обзоре Тейлора [4]. Вообще говоря, и для животных, и для растительных тканей пригодны одни и те же методы при условии, что приняты все необходимые меры предосторожности для подавления рибонуклеазной активности (разд. 2.7).

2.3. Выделение РНК из целых клеток или цитоплазматических фракций

2.3.1. Фенольные методы

В большинстве методов выделения РНК, которые начинаются с получения неочищенных гомогенатов или экстрактов клеток, для денатурации белка и его отделения от нуклеиновых кислот используют фенол. Как правило, ткань гомогенизируют в забуференных солевых растворах, иногда содержащих 0,35 М сахарозу, чтобы предотвратить разрушение лизосом и высвобождение рибонуклеаз. Для разрушения субклеточных мембран часто добавляют неионные детергенты типа тритона X-100 или Nonidet P-40. Некоторые прочные ткани приходится перед добавлением раствора для гомогенизации растирать в жидком азоте. Для подавления рибонуклеаз используют большие объемы раствора, в которых они сильно разводятся (10—20-кратные по отношению к весу ткани), а также высокие значения pH (8,5—

Таблица 3. Выделение цитоплазматической РНК из печени методом фенольной экстракции [6]

1. Ополосните ткань и гомогенизируйте ее в 15 объемах холодного буфера, имеющего состав:
   0,35 М сахароза
   50 мМ KCl
   10 мМ ацетат магния
   1,3%-ный тритон X-100
   0,2 М трис-ацетат, pH 8,5
2. Отцентрифугируйте 5 мин при 2000*g*, чтобы осадить ядра.
3. Соберите супернатант, добавьте ДСН до 1% и ЭДТА до 2 мМ и продолжайте выделение при комнатной температуре.
4. Встряхивайте супернатант 10 мин с 2 объемами смеси фенол — хлороформ (1 : 1, по объему), предварительно уравновешенной буфером, содержащим все перечисленные компоненты.
5. Отцентрифугируйте 10 мин при 10 000*g* при 20 °С.
6. Соберите верхнюю (водную) фазу и перенесите ее в лед. Постарайтесь не загрязнить ее материалом интерфазы.
7. Встряхивайте фенольный слой и интерфазу с равным объемом 0,1 М ацетата натрия, 2 мМ ЭДТА, 0,1 М трис-ацетата, pH 9,0.
8. Отцентрифугируйте, как в п. 5.
9. Объедините водный слой с предыдущей верхней фазой (п. 6) и снова проэкстрагируйте равным объемом смеси фенол — хлороформ.
10. Отцентрифугируйте, как в п. 5.
11. Соберите водную фазу. Добавьте ацетат калия, pH 5,5, до 0,2 М и осадите РНК 2,5 объемами холодного (—20 °С) этанола. Перемешайте и оставьте при —20 °С на 16 ч.
12. Отцентрифугируйте 10 мин при 2000*g* при 0 °С.
13. Отбросьте супернатант и промойте осадок, суспендировав его в 3 М ацетате натрия, pH 6,0.
14. Повторите операции пп. 12 и 13.
15. Ресуспендируйте осадок в холодном 70%-ном этаноле, 0,1 М ацетате натрия и отцентрифугируйте, как в п. 12.
16. Слейте супернатант и подсушите осадок слабым током чистого азота.
17. Растворите РНК в воде или буфере и храните при —70 °С[1].

[1] Гораздо безопаснее хранить РНК в виде суспензии в этаноле с ацетатом натрия (п. 15); в таком виде очищенная РНК хранится не менее года без деградации даже при —20 °С. — *Прим. перев.*

9,0) и ионной силы (0,2—0,5 М соль). Последние два условия особенно важны при работе с растительными тканями [5]. Если нужна только цитоплазматическая РНК, то гомогенат вначале центрифугируют, чтобы удалить ядра, а затем добавляют какой-нибудь ионный детергент, например ДСН или саркозил (N-лаурилсаркозинат натрия), обычно вместе с ЭДТА, чтобы разрушить нуклеопротеиновые комплексы и подавить рибонуклеазную активность. Затем раствор экстрагируют фенолом или смесью фенола с хлороформом (1 : 1), предварительно насыщенными буфером для гомогенизации. Экстракцию проводят с помощью интенсивного встряхивания. Органическую и водную фазы разделяют центрифугированием, во время которого денатурированный белок собирается в интерфазе. РНК собирается

Таблица 4. Выделение цитоплазматической РНК из культуры клеток методом фенольной экстракции [7]

1. Отцентрифугируйте суспензию клеток 5 мин при 1000*g* и промойте клетки, ресуспендируя их в 10 объемах холодного фосфатно-солевого буфера (0,14 М NaCl, 2,7 мМ KCl, 6,5 мМ Na_2HPO_4, 1,5 мМ KH_2PO_4, pH 7,2).
2. Повторите центрифугирование и промывку еще трижды.
3. Суспендируйте клетки в холодном лизирующем буфере (5 мл буфера на 10^8 клеток), имеющем состав:
   0,14 М NaCl
   1,5 мМ $MgCl_2$
   0,5% Nonidet P-40
   10 мМ трис-HCl, pH 8,6
   плюс 10 мМ ванадилрибонуклеозидный комплекс
   или 1000 ед./мл ингибитора рибонуклеаз из плаценты человека
   Быстро перемешайте суспензию на встряхивателе[1]
4. Наслоите лизат на равный объем 24%-ной (вес/объем) сахарозы, 1%-ного Nonidet P-40 в холодном лизирующем буфере и оставьте на 5 мин при 0 °С.
5. Отцентрифугируйте 20 мин при 8500*g* в бакет-роторе (например, в роторе Sorvall HB-4).
6. После центрифугирования отберите верхний слой и добавьте равный объем следующего буфера:
   0,3 М NaCl
   25 мМ ЭДТА
   2%-ный ДСН
   0,4 мг/мл протеиназы К (BRL или Sigma)
   0,2 М трис-HCl, pH 7,5
   Проинкубируйте 30 мин при 37 °С.
7. Быстро встряхните материал с равным объемом смеси фенол—хлороформ—изоамиловый спирт (50 : 50 : 1, по объему), содержащей 0,1% 8-гидроксихинолина. Смесь должна быть предварительно уравновешена 0,15 М NaCl, 1 мМ ЭДТА, 50 мМ трис-HCl, pH 7,5.
8. Отцентрифугируйте смесь 10 мин при 10 000*g* при 18 °С в стаканах из стекла Corex (Dupont).
9. Отберите верхнюю водную фазу и добавьте 2,5 объема холодного (—20 °С) этанола. Оставьте на 2—18 ч при —20 °С, чтобы сформировался осадок РНК.
10. Отцентрифугируйте препарат 10 мин при 10 000*g* при 4 °С в стаканах из стекла Corex.
11. Отбросьте супернатант и промойте осадок, ресуспендируя его в 75%-ном этаноле, 0,1 М ацетате натрия, pH 5,3.
12. Отцентрифугируйте, как указано в п. 10. Отбросьте супернатант и подсушите осадок слабым током азота.
13. Растворите осадок в стерильной воде или буфере и храните при —70 °С.

[1] Многие клетки не лизируются таким образом и будут полностью утеряны на следующей стадии центрифугирования. Чтобы их разрушить, следует обработать суспензию в гомогенизаторе Даунса (со стеклянным пестиком). — *Прим. перев.*

в основном в верхнем водном слое, но некоторое ее количество захватывается интерфазным материалом. Поэтому интерфазу следует повторно экстрагировать свежей порцией буфера и объединить водные фазы. Чтобы улучшить выход РНК, можно уменьшить объем белковой интерфазы, кратковременно обрабо-

тав перед фенольной экстракцией клеточный экстракт протеиназой К (200 мкг/мл, 37 °С, 30 мин). Присутствие хлороформа также способствует выходу РНК в водную фазу. В органическую смесь для экстракции часто добавляют и другие компоненты, например 1% (по объему) изоамилового спирта (чтобы понизить вспенивание) и 0,1% (вес/объем) 8-гидроксихинолина (в качестве антиоксиданта для фенола и хелатирующего агента для разрушения РНК-белковых взаимодействий).

Нуклеиновые кислоты осаждают из водного слоя добавлением 2,5 объема холодного (—20 °С) этанола в присутствии 0,2 М соли (обычно используют ацетат натрия или калия) при pH 5,0. Это значение pH выбрано, чтобы свести к минимуму химическое расщепление РНК. Время, необходимое для осаждения, зависит от количества РНК; оно колеблется от 2 ч до 12—16 ч при —20 °С. Затем РНК осаждают центрифугированием и промывают холодным 70%-ным этанолом, 0,1 М ацетатом натрия, чтобы удалить следы фенола. При ресуспендировании осадка в 3М ацетате натрия и последующем центрифугировании удаляются ДНК и низкомолекулярные РНК (тРНК и 5S-РНК), а также полисахариды и гликопротеины. Наконец препарат РНК снова промывают холодным 70%-ным этанолом, 0,1 М ацетатом натрия и осторожно подсушивают осадок в потоке азота. После этого осадок легко растворяется в стерильной воде или в буфере для дальнейшей работы. Выход и чистоту препарата РНК оценивают по поглощению разбавленной пробы при 260 и 280 нм: 1 мг/мл РНК эквивалентен 23 единицам поглощения при 260 нм, и чистая РНК имеет соотношение $A_{260}:A_{280}=2{,}0$.

Две методики выделения РНК с использованием описанных выше процедур суммированы в табл. 3 для целой ткани и в табл. 4 для культуры клеток.

2.3.2. Методы с использованием солей гуанидиния

В последние годы был разработан ряд сходных методов выделения РНК без использования фенола [8—10]. Они основаны на способности солей гуанидиния в высоких концентрациях и других денатурирующих агентов разрушать комплекс рибонуклеопротеинов (РНП) и особенно полезны для клеток с высоким уровнем эндогенной рибонуклеазной активности. Например, Чиргуин и др. [8] описали оптимальные условия выделения интактной РНК из поджелудочной железы крысы. Для этого ткань быстро разрушают в присутствии 0,1%-ного 2-меркаптоэтанола, 4 М гуанидинийтиоцианата (чтобы восстановить и денатурировать рибонуклеазы), центрифугируют и осаждают РНК из супернатанта этанолом, подкисленным уксусной кислотой. Осадок растворяют в 7,5 М гуанидинийхлориде и снова осаждают РНК этанолом. Эту операцию повторяют и переосаж-

Таблица 5. Выделение РНК в присутствии гуанидинийтиоцианата [8]

1. Быстро и тщательно прогомогенизируйте ткань в течение 30—60 с в гомогенизаторе с тефлоновым пестиком, присоединенным к скоростному электромотору, в 20 объемах следующего буфера при 20 °С:
   4 М гуанидинийтиоцианат
   0,5%-ный (вес/объем) саркозил
   0,1 М 2-меркаптоэтанол
   0,1%-ный (по объему) Antifoam A (Sigma)
   (противовспенивающая добавка)
   25 мМ цитрат натрия, pH 7,0
2. Отцентрифугируйте 10 мин при 8500*g* при 10 °С.
3. Отберите супернатант, добавьте к нему 0,025 объема 1 М уксусной кислоты и 0,75 объема этанола, тщательно перемешайте и оставьте на ночь при —20 °С.
4. Отцентрифугируйте 10 мин при 5000*g* при —10 °С.
5. Слейте супернатант и как следует ресуспендируйте осадок, гомогенизируя его в 0,5 объема (относительно объема буфера при первоначальной гомогенизации) 7,5 М гуанидинийхлорида, 5 мМ ДТТ, 25 мМ цитрата натрия, pH 7,0. Иногда помогает кратковременное прогревание при 68 °С.
6. Снова осадите РНК, добавив 0,025 объема (относительно объема гуанидинийхлорида) 1 М уксусной кислоты и 0,5 объема этанола. Оставьте смесь при —20 °С не менее чем на 3 ч.
7. Отцентрифугируйте, как в п. 4.
8. Повторите операции пп. 5—7, уменьшив все объемы вдвое.
9. Удалите супернатант, тщательно ресуспендируйте осадок в этаноле при комнатной температуре и отцентрифугируйте, как указано в п. 4.
10. Слейте спирт и подсушите осадок слабым током чистого азота.
11. Растворите РНК в холодной воде (1 мл на 1 г исходной ткани) и осветлите раствор центрифугированием при 22 500*g* при 10 °С в течение 10 мин.
12. Сохраните супернатант и ресуспендируйте осадок в воде (0,5 мл на 1 г исходной ткани). Затем отцентрифугируйте осадок, как указано в п. 11. Отберите супернатант.
13. Объедините супернатанты (п. 11 и 12), добавьте 0,1 объема 2 М ацетата калия, pH 5,0, и 2 объема этанола, перемешайте и оставьте на ночь при —20 °С.
14. Отцентрифугируйте препарат 20 мин при 13 000*g* при —10 °С.
15. Отбросьте супернатант, ресуспендируйте осадок в 95%-ном этаноле и снова отцентрифугируйте, как указано в п. 14.
16. Подсушите осадок током азота и растворите в воде или в буфере (1 мл на 1 г ткани). Храните при —70 °С.

дают РНК этанолом. Методика, приведенная в табл. 5, с успехом применяется и для других тканей и культур клеток. Этот метод был модифицирован: исходный гомогенат наслаивают на раствор хлористого цезия с достаточно высокой плотностью, чтобы ДНК не осаждалась при последующем центрифугировании [8]. Затем РНК, которая в этих условиях осаждается на дно, ресуспендируют в гуанидинийхлориде и промывают с помощью переосаждения этанолом. Эта модификация особенно удобна для выделения небольших количеств РНК. Есть сообщение, что полученный таким образом препарат из печени в пять раз активнее при трансляции, чем мРНК, полученная фенольной экстракцией [9].

2.3.3. Метод выделения РНК с использованием раствора LiCl и мочевины

Для получения интактных, активных в трансляции мРНК из различных источников может быть использован метод гомогенизации замороженной ткани в 3 М LiCl, 6 М мочевине [10]. В этих условиях рибонуклеазы ингибируются и происходит осаждение РНК, почти свободной от фрагментов ДНК, полисахаридов и белков. В табл. 6 описана методика, которая впервые была использована для выделения иммуноглобулиновой мРНК из мышиных миеломных опухолей [10].

Таблица 6. Выделение РНК в растворе хлористого лития и мочевины [10]

1. Прогомогенизируйте замороженную ткань в 10 мл 3 М LiCl, 6 М мочевины на 1 г ткани 2 мин при 0 °С в гомогенизаторе Уоринга на максимальной скорости. Оставьте гомогенат на ночь при 0 °С.
2. Отцентрифугируйте гомогенат 20 мин при 16 000g при 0 °С. Отбросьте супернатант.
3. Растворите осадок в 0,5%-ном ДСН, 10 мМ трис-HCl, pH 7,6 (10 мл на 1 г исходной ткани), и проэкстрагируйте раствор равным объемом смеси хлороформ — изоамиловый спирт (24 : 1, по объему), встряхивая эмульсию в течение 10 мин.
4. Отцентрифугируйте смесь 10 мин при 10 000g при 18 °С в пробирках из стекла Corex в бакет-роторе.
5. Соберите верхнюю (водную) фазу и продолжайте выделение, как указано в пп. 13—16 в табл. 5.

2.4. Выделение полисомной РНК

2.4.1. Высокоскоростное центрифугирование полисом

Если необходимо исследовать природу и состав популяции транслируемых мРНК в клетках (а не суммарную клеточную мРНК), то прежде, чем выделять собственно РНК, необходимо получить полисомы. Кроме того, с получения полисом часто начинают выделение индивидуальных мРНК. В литературе имеется множество описаний выделения полисом с помощью дифференциального центрифугирования. Согласно классической методике, постмитохондриальный супернатант клеточного лизата или гомогената наслаивают на 1 М сахарозу в нейтральном или слабощелочном буфере (pH 7,6—8,5) и центрифугируют (произведение ускорения на время центрифугирования составляет $3—4 \cdot 10^5$ g ч.). Затем полисомный осадок ресуспендируют в буфере для дальнейшего фракционирования или анализа. Общий метод выделения полисом описан в табл. 7. Хотя, как правило, этот метод надежен, в некоторых случаях возникают сложности. На выделение полисом уходит сравнительно много времени, и часть мРНК может при этом деградировать под действием

Таблица 7. Общие методы получения и фракционирования по размеру полисом из эукариотических клеток

Получение полисом

1. Суспендируйте ткань или клетки в трех объемах холодного буфера для выделения полисом[1], имеющего следующий состав:
   0,25 М сахароза
   0,1 М KCl
   5 мМ ацетат магния
   6 мМ 2-меркаптоэтанол
   20 мМ трис-HCl, pH 7,6
   Прогомогенизируйте материал 3—20 движениями пестика в гомогенизаторе тефлон — стекло (Поттера) или стекло — стекло (Даунса)[2], поддерживая температуру 4 °С.
2. Отцентрифугируйте гомогенат 10 мин при 10 000*g*, чтобы удалить дебрис, плазматические мембраны, ядра и митохондрии.
3. Добавьте к постмитохондриальному супернатанту тритон X-100[3] до конечной концентрации 1% (по объему). Наслоите смесь на равный объем буфера для выделения полисом, содержащего 1,0 М сахарозу.
4. Отцентрифугируйте 2 ч при 260 000*g* при 4 °С[4].
5. Отсосите и отбросьте супернатант. Осторожно промойте стенки центрифужной пробирки холодным буфером для выделения полисом без сахарозы. Переверните пробирку и дайте жидкости стечь на фильтровальную бумагу. Затем осторожно суспендируйте полисомы в холодном буфере для выделения полисом без сахарозы (0,5 мл на 1 г ткани) с помощью гомогенизатора Даунса.

Фракционирование полисом по размеру

1. Для фракционирования полисом по размеру приготовьте сахарозные градиенты (например, 10—40%, 15—45%, 20—50%[5]) в холодном буфере, содержащем 0,1 М KCl[6], 3 мМ ацетат магния, 20 мМ трис-HCl, pH 7,6.
2. Наслоите обработанный детергентом постмитохондриальный супернатант (п. 3 в верхней части таблицы) или ресуспендированные полисомы (п. 5 там же) на каждый градиент в минимальном объеме. Обычно на градиент объемом 10 мл наносят 100—400 мкг полисом (по РНК). Отцентрифугируйте 1 ч при 150 000*g* при 4 °С[5].
3. Фракционируйте градиенты, пропустив их через проточный денситометр с регистрацией поглощения при 260 нм со скоростью 1—5 мл/мин (скорость зависит от общего объема градиента). Раскапайте каждый градиент на 20—30 фракций для дальнейшего анализа или очистки РНК.

---

[1] Описанный метод годится для такой ткани, как, например, печень. Состав буфера для выделения полисом можно изменять в зависимости от специфических особенностей исследуемой ткани. Например, для мышц необходимо использовать более высокую концентрацию соли, чтобы не вызвать осаждения сократительных белков; другие условия также могут существенно отличаться от указанных в настоящей таблице [11]. Для получения экстракта из многих типов культивируемых клеток млекопитающих и последующего выделения полисом можно использовать вместо приведенного способа (п. 1) гипотонический шок и лизис с помощью детергентов (гл. 9, табл. 11).

[2] Тип гомогенизатора, величины его зазора и число движений поршня зависят от ткани, и их следует подбирать экспериментально.

[3] Тритон X-100 растворяет мембраны эндоплазматического ретикулума, освобождая связанные полисомы. Если детергент используют для лизиса клеток на первой стадии (п. 1), то добавлять его еще раз уже не нужно.

[4] Некоторые методики включают центрифугирование полисом через слой 2 М сахарозы. В этом случае следует увеличить время либо скорость центрифугирования, чтобы выход полисом был максимальным. Выход полисом можно оценить, определяя количество РНК в препарате очищенных полисом.

[5] Концентрации растворов сахарозы, формирующих градиент, время и скорость центрифугирования определяются происхождением образца и распределением требуемых полисом по размеру. Как правило, неочищенные постмитохондриальные супернатанты следует фракционировать в градиентах с концентрацией сахарозы 20—50%, чтобы свести к минимуму загрязнение полисом белками, диффундирующими из верхней части градиента. Если на градиент наносят уже очищенные полисомы, то такой проблемы не возникает.

[6] Для выделения полисом из мышц используют 0,25 М NaCl или 0,25 М KCl [11].

Таблица 8. Быстрое выделение полисом осаждением ионами магния [12]

1. Измельчите ткань и тщательно прогомогенизируйте ее в девяти объемах холодного буфера следующего состава:
   25 мМ NaCl
   5 мМ $MgCl_2$
   1 мг/мл гепарина
   2% тритона X-100
   25 мМ трис-HCl, pH 7,5
2. Отцентрифугируйте гомогенат 5 мин при 27 000*g* и отберите супернатант.
3. Добавьте равный объем буфера для гомогенизации, содержащего 0,2 М $MgCl_2$, и проинкубируйте 1 ч при 4 °С.
4. Наслоите 8 мл этого препарата на 4 мл 1 М сахарозы в 25 мМ NaCl, 0,1 М $MgCl_2$, 25 мМ трис-HCl, pH 7,5, и отцентрифугируйте 10 мин при 27 000*g*.
5. Отсосите и отбросьте супернатант и часть слоя сахарозы.
6. Ополосните стенки пробирки водой, отсосите воду и слейте остальной раствор сахарозы.
7. Дайте жидкости стечь с осадка полисом, протрите стенки пробирки фильтровальной бумагой и ресуспендируйте полисомы в подходящем буфере.

эндогенных рибонуклеаз. Возможно и механическое дробление РНК при осаждении и ресуспендировании полисом, особенно если речь идет о длинных мРНК. Полисомный осадок могут загрязнять некоторые РНП-частицы неполисомной природы. Последние две проблемы можно решить, если выделять полисомы центрифугированием в градиенте сахарозы (табл. 7, вторая часть), а не дифференциальным центрифугированием. Наконец, выход полисом из некоторых тканей далеко не количественный, причем наиболее значительные (и, возможно, избирательные) потери характерны для начальных стадий низкоскоростного центрифугирования гомогената.

2.4.2. Осаждение полисом магнием

Вместо высокоскоростного центрифугирования полисом можно вызвать агрегацию (обратимую) этих структур добавлением солей магния до конечной концентрации 0,1 М. Это позволяет осадить полисомы из неочищенного гомогената низкоскоростным центрифугированием [12]. Соответствующая методика приведена в табл. 8. Преимущество этого подхода состоит в том, что он позволяет сравнительно быстро получить интактные полисомы при условии обычных мер предосторожности, предпринимаемых с целью подавления рибонуклеазной активности. При добавлении ионов магния осаждаются также неполисомные комплексы мРНП, но не осаждается свободная РНК.

2.4.3. Фракционирование полисом

Часто бывает желательно или необходимо разделить полисомы различных классов до выделения тех мРНК, которые в них содержатся. Это может оказаться необходимым, чтобы

Таблица 9. Разделение связанных и свободных полисом клеток мышиной миеломы [16, 17]

1. Суспендируйте промытые клетки в концентрации $5 \cdot 10^8$ клеток/мл в холодном гипотоническом буфере (10 мМ KCl, 1,5 мМ $MgCl_2$, 10 мМ трис-HCl, pH 7,4). Дайте клеткам набухнуть в течение 5 мин.
2. Прогомогенизируйте клетки десятью движениями поршня в стеклянном гомогенизаторе Даунса с минимальным зазором.
3. Разведите гомогенат клеток в 5 раз буфером, имеющим следующий состав:
   2,5 М сахароза
   0,15 М KCl
   5 мМ $MgCl_2$
   50 мМ трис-HCl, pH 7,4
4. Наслоите этот препарат на 2 объема 2,5 М раствора сахарозы в том же буфере в центрифужной пробирке. Затем наслоите сверху 3 объема 2,05 М сахарозы и 1 объем 1,2 М сахарозы в том же буфере.
5. Отцентрифугируйте 5 ч при 82 000*g* при 4 °С в роторе Beckman SW28.1 или в эквивалентном ему роторе.
6. Соберите фракции, начиная со дна, для чего проколите пробирку иглой от шприца. Ядра осаждаются в слой 2,5 М сахарозы. Свободные полисомы остаются в той области, куда был внесен образец, а связанные полисомы всплывают до границы 1,20 М и 2,05 М сахарозы.
7. Обработайте связанные полисомы 0,5%-ным (вес/объем) дезоксихолатом натрия и 0,5%-ным (вес/объем) детергентом Brij 58, чтобы растворить мембраны.
8. Отцентрифугируйте обработанные детергентом связанные полисомы и свободные полисомы по отдельности в градиенте сахарозы 15—30% в буфере, содержащем 80 мМ KCl, 5 мМ $MgCl_2$, 50 мМ трис-HCl, pH 7,4, на подушку (4 мл) из 69%-ной сахарозы в том же буфере. Центрифугирование проводите в роторе Beckman SW 28 или эквивалентном ему при скорости 27 000 об/мин (96 000*g*) в течение 8,5 ч.
9. Соберите полисомы, находящиеся на границе 30%-ной и 69%-ной сахарозы и разведите их одним объемом дистиллированной воды. Теперь их можно использовать или хранить при —70 °С.

определить, какие белки синтезируются отдельными популяциями полисом (например, связанными с мембранами и свободными полисомами); такое разделение может использоваться также в качестве первоначального этапа очистки индивидуальных мРНК, основанного на особенностях тех полисом, в которых они содержатся. В частности, широко используется процедура фракционирования по размеру в градиентах сахарозы. Она особенно полезна для выделения индивидуальных мРНК, наиболее широко представленных в общей популяции, если они существенно больше или меньше по размеру, чем мРНК в среднем. Если имеются специфические антитела к тому или иному белку, кодируемому определенной мРНК, то используется еще один чрезвычайно эффективный подход, основанный на антигенной специфичности новообразованных полипептидных цепей в составе полисом, содержащих соответствующую мРНК. Эти подходы описаны ниже.

1. *Разделение свободных и связанных полисом.* Был опубли-

кован ряд хороших методик практически количественного фракционирования связанных с мембранами и свободных полисом и последующего выделения из них мРНК. Наиболее подробно изучались в этом отношении ткани и клетки, активно секретирующие белки, в частности печень крысы [13—15] и культуры клеток мышиной миеломы [16—18]. Одна из возможных трудностей, возникающих при этом, — загрязнение связанных полисом лизосомами, богатыми рибонуклеазной активностью. В связи с этим были разработаны методы отделения фракции шероховатых микросомных мембран от лизосом без разрушения последних [13—18]. В табл. 9 приведена одна из таких методик, разработанная для миеломных клеток.

2. *Фракционирование полисом по размеру.* При условии соблюдения необходимых мер предосторожности, чтобы избежать разрушения полисом под действием рибонуклеаз (раздел 2.7) или в результате отделения рибосом во время лизиса клеток (гл. 9, разд. 7.1.2), можно фракционировать по размеру различные классы мРНК центрифугированием соответствующих полисом в непрерывных градиентах сахарозы. Вообще говоря, чем длиннее мРНК, тем крупнее полисомы, и наоборот, хотя возможны и отклонения от этого правила. Если некоторые индивидуальные мРНК индуцируют синтез белка более или менее эффективно, чем мРНК в среднем, то это приводит к повышению или понижению плотности упаковки рибосом на мРНК. Поскольку большинство мРНК близки по размеру, этот метод фракционирования мРНК применим только для частичной очистки особенно коротких мРНК, вроде тех, которые кодируют гистоны [19] или рибосомные белки [20], или особенно длинных мРНК, кодирующих, например, тяжелую цепь миозина [11].

Для фракционирования полисом по размеру обычно проводят центрифугирование при 4 °С в линейных градиентах концентрации сахарозы 10—40%, 15—45% или 20—50% в буфере, содержащем, например, 0,1 М KCl, 3 мМ ацетат магния и 20 мМ трис-HCl, pH 7,6 (табл. 7). В некоторых случаях, в частности при фракционировании полисом из мышц [11], необходима более высокая концентрация соли, чтобы предотвратить агрегацию белка и осаждение. Режим центрифугирования и концентрация сахарозы в градиенте зависят от размера выделяемых полисом, и их следует подобрать эмпирически.

3. *Иммунопреципитация полисом.* Здесь можно использовать самые различные подходы, основанные на прямой или непрямой иммунопреципитации [4]. В первом случае специфические антитела связываются с полисомами, к ним добавляют антиген-носитель и антитела в достаточном количестве, чтобы образовать иммунопреципитат, который можно затем отцентрифугировать через слой сахарозы. Если используется непрямая иммунопре-

Таблица 10. Непрямая иммунопреципитация полисом с помощью вторичных антител [23, 25]

1. Силиконируйте всю стеклянную посуду, которая будет использована в опыте.
2. Суспендируйте полисомы в концентрации 10—25 единиц A_{260}/мл в холодном буфере для связывания с антителами:
   0,15 М NaCl
   5 мМ $MgCl_2$
   2 мг/мл гепарина
   25 мМ трис-HCl, pH 7,1
3. Отцентрифугируйте 3 раза по 10 мин при 19 000g, сохраняя каждый раз супернатант. В результате этой процедуры удаляются нерастворимые агрегаты полисом.
4. Добавьте очищенные антитела (свободные от рибонуклеаз[1]) до концентрации ~150 мкг/мл; оптимальную концентрацию антител следует подобрать экспериментально. Проинкубируйте смесь 40 мин. при 2 °С.
5. Добавьте очищенные вторичные антитела[1] (против первых антител) в 50—70-кратном избытке и продолжайте инкубацию 2 ч при 2 °С.
6. Наслоите инкубационную смесь на 3 мл 0,5 М сахарозы, наслоенной в свою очередь на 6 мл 1,0 М сахарозы. Оба раствора сахарозы готовят на буфере для связывания антител с добавлением 0,4% тритона X-100. Отцентрифугируйте 20 мин при 16 000g.
7. Отсосите супернатант и растворы сахарозы и отбросьте их. Осторожно промойте стенки пробирок 3 раза буфером для связывания антител, стараясь не взмутить осадок. Эта промывка позволяет снизить неспецифическое загрязнение иммунопреципитатов.
8. Суспендируйте каждый осадок в 1 мл буфера для связывания антител и снова осадите их через сахарозу, как описано в п. 6.

[1] Очистка антител описана в работах [20, 23].

ципитация, то при добавлении вторичных антииммуноглобулиновых антител к комплексу полисом с первичными антителами образуется нерастворимый комплекс [21—23]. Стандартная методика приведена в табл. 10. Вместо преципитации комплексы полисом с первичными антителами могут быть адсорбированы на аффинной колонке, к носителю которой ковалентно пришит нерастворимый антиген [25].

Все эти методы с успехом применялись для многих объектов, в частности, весьма удачно были выделены мРНК яичного белка из яйцеводов кур и мРНК сывороточного альбумина из печени [4, 22]. После экстракции из иммунопреципитатов эти РНК были получены в интактном виде и с высоким выходом. Пайвар и Шимке [24] выяснили некоторые наиболее важные условия успешной иммунопреципитации мРНК. К ним относятся высокая степень чистоты исходного антигена, который используется для получения антител; очистка специфических антител от рибонуклеазных примесей; и снижение неспецифического осаждения полисом в иммунопреципитатах. Если эти условия соблюдены, то можно очистить индивидуальную мРНК, составляющую всего 1% всей популяции мРНК.

2.4.4. Выделение мРНК из полисом

РНК легко получить как из препарата суммарных полисом, так и из полисомных фракций, выделенных на основании их ассоциации с мембранами, размера или способности к иммунопреципитации специфическими антителами. Принципы выделения при этом те же, что и при выделении суммарной клеточной или цитоплазматической РНК (разд. 2.3), т. е. депротеинизация полисом, разделение белка и РНК, и осаждение, и промывка РНК. Две подобные методики приведены в табл. 11.

Таблица 11. Выделение РНК из очищенных полисом

Метод выделения в градиенте сахарозы в присутствии ДСН [23, 26].

1. Добавьте к суспензии полисом или комплекса полисом с антителами ЭДТА до 50 мМ, NaCl до 0,1 М и ДСН до 1%. Если нужно, доведите pH до 7,0, добавив 0,2 объема 1,0 М трис-HCl, pH 7,0.
2. Добавьте 2 объема этанола и оставьте смесь не менее чем на 6 ч при —20 °С, чтобы сформировался осадок РНК.
3. Отцентрифугируйте 20 мин при 14 000*g* при 0 °С.
4. Растворите осадок в 0,5%-ном ДСН, 5 мМ ЭДТА, 20 мМ ацетате натрия, pH 5,0. Наслоите раствор на градиент сахарозы 5—20%, приготовленный на таком же буфере, и отцентрифугируйте 6 ч (195 000*g*, 20 °С, в роторе Beckman SW41 или эквивалентном ему).
5. Пропустите градиент через проточный денситометр, регистрирующий поглощение при 260 нм, и соберите материал, находящийся в нижней части пробирки (>10S). Осадите РНК этанолом, как описано в пп. 1 и 2[1].

Метод выделения с помощью протеиназы К и фенола [16]

1. Добавьте суспензию полисом к равному объему горячего (100 °С) ДСН-буфера:
   1% ДСН
   0,2 М NaCl
   40 мМ ЭДТА
   20 мМ трис-HCl, pH 7,4
   Проинкубируйте 2 мин при 100 °С.
2. Быстро охладите смесь до 30 °С и добавьте протеиназу К до концентрации 0,5 мг/мл. Проинкубируйте 10 мин при той же температуре.
3. Добавьте концентрированный раствор трис-HCl, pH 9,0, до 0,1 М и ДСН до 1% и экстрагируйте трижды равным объемом смеси фенол — хлороформ (1 : 1, по объему), как описано в табл. 3 (пп. 4 и 5), отбрасывая каждый раз фенольный слой.
4. Осадите РНК из водной фазы, добавив 2,5 объема этанола и 0,1 объема 2 М ацетата натрия, pH 5,2. Оставьте на ночь при —20 °С. Отцентрифугируйте осадок РНК.

[1] Центрифугирование в градиенте сахарозы позволяет отделить мРНК и рРНК от тРНК, денатурированных белков и гепарина, которые остаются в верхней части градиента. Дальнейшую очистку от этих молекул проводят следующим образом. Спиртовой осадок РНК промывают 2,0 М LiCl, 5 мМ ЭДТА, а затем 3 М ацетатом натрия, pH 5,5, 5 мМ ЭДТА и, наконец, 70%-ным этанолом, содержащим 0,15 М NaCl.

2.5. Выделение вирусной РНК

Выделение РНК вирусов эукариот основано в основном на тех же принципах, что и выделение клеточной РНК (разд. 2.3). Если имеется очищенный препарат вируса, то из вирионов

Таблица 12. Выделение РНК из очищенного вируса энцефаломиокардита[1]

1. Суспендируйте очищенный вирус в концентрации 1 мг/мл в 10 мМ 2-меркаптоэтаноле, 50 мМ трис-HCl, pH 7,6, и добавьте 112 мкл 5%-ного дезоксихолата натрия и 125 мкл 0,1 М ЭДТА на каждый миллиметр суспензии вируса.
2. Проинкубируйте 2 мин при 42 °С, а затем добавьте равный объем теплого (42 °С) фенола, предварительно уравновешенного 50 мМ трис-HCl, pH 7,6. Перемешивайте в течение 6 мин, поддерживая температуру 42 °С.
3. Охладите смесь в течение 10 мин во льду и затем отцентрифугируйте 10 мин при 10 000*g* при 4 °С. Отберите водный слой, стараясь не загрязнить его материалом интерфазы.
4. Еще раз проэкстрагируйте фенольный слой половинным объемом 50 мМ трис-HCl, pH 7,6, и снова отцентрифугируйте, как в пп. 2 и 3. Объедините водный слой с раствором, полученным в п. 3.
5. Осадите РНК из объединенной водной фазы, добавив 2,5 объема этанола и KCl до концентрации 0,1 М. Проинкубируйте при —20 °С в течение ночи.
6. Осадите РНК центрифугированием при 2000*g* в течение 5 мин при 4 °С.
7. Тщательно осушите осадок РНК при —20 °С, а затем ресуспендируйте его в 1 мл 70%-ного этанола. Отцентрифугируйте, как указано в п. 6.
8. Повторите операции п. 7.
9. Осушите осадок РНК и растворите его в небольшом объеме стерильной воды. Разведите небольшую аликвоту и измерьте поглощение при 260 нм, чтобы определить концентрацию РНК, как описано в тексте (разд. 2.3.1).
10. Храните раствор РНК в небольших аликвотах при —70 °С.

[1] Эта методика приведена в качестве примера одной из множества процедур, которые были разработаны для различных вирусов. Методы выделения РНК из других вирусов можно найти в оригинальных работах.

сравнительно легко получить нуклеиновую кислоту фенольным методом (табл. 12) или методом солевой экстракции [26]. Вирусные частицы разрушают детергентом (ДСН или дезоксихолатом натрия) в присутствии ЭДТА, а затем добавляют фенол. После обычного перемешивания и разделения фаз центрифугированием фенольный слой повторно экстрагируют свежей порцией буфера и водные фазы объединяют. Часто дополнительно экстрагируют этот раствор новыми порциями фенола. В некоторых случаях эти обработки проводят при повышенной температуре (чаще всего при 42 °С). Вирусную РНК осаждают этанолом, промывают и в дальнейшем обращаются с ней точно так же, как и с другими препаратами РНК.

Выделение вирусных РНК из зараженных или трансформированных вирусом клеток проводят в основном так же, как и из подобных незараженных клеток (разд. 2.3). В действительности многие виды вирусных РНК можно получить только таким путем, поскольку РНК, участвующие в процессах вирусной репликации или трансформации клеток, часто не идентичны тем РНК, которые обнаруживаются в составе вирионов. На поздних стадиях литического заражения синтез белков клетки-хозяина обычно подавлен и преобладает трансляция вирусных полипептидов.

Поэтому выделение полисомной РНК (см. разд. 2.4) на соответствующих стадиях заражения может дать фракцию мРНК, существенно обогащенную определенными вирусными последовательностями. Однако некоторые клеточные мРНК обычно остаются в неполисомной и даже в полисомной фракциях, поэтому в дальнейшем может понадобиться дополнительная очистка вирусных РНК. Соответствующие методики приведены в следующем разделе.

2.6. Фракционирование РНК

После выделения суммарной клеточной РНК, цитоплазматической РНК, полисомной РНК, неполисомной РНК или полисомной РНК из иммунопреципитата с помощью описанных выше методов можно переходить к следующей стадии — удалению из суммарного препарата ненужной мРНК. Для этого существует несколько методов, которые можно в целом разделить на две группы: фракционирование РНК по размеру и по нуклеотидной последовательности.

2.6.1. Фракционирование РНК по размеру

Центрифугирование в градиенте плотности сахарозы. Этот метод широко использовался для разделения различных классов РНК по молекулярной массе или по седиментационным свойствам. Коэффициенты седиментации мРНК составляют 6—35 S и более, причем большинство попадает в интервал 16—20 S. Поэтому центрифугирование в градиенте сахарозы особенно полезно при очистке очень длинных или очень коротких мРНК, а также для отделения многих мРНК от тРНК и более крупных (28 S) рРНК. Основная проблема заключается в том, как избежать агрегации РНК во время осаждения через сахарозу. Агрегацию можно свести к минимуму, если прогреть РНК перед фракционированием в течение 10 мин при 65 °С или проводить разделение в сахарозе в денатурирующих условиях. Во втором случае РНК растворяют в буфере, содержащем такие денатурирующие агенты, как 0,5%-ный ДСН, или 99%-ный диметилсульфоксид (ДМСО), или 70%-ный формамид, которые вводят в состав градиента. Методика центрифугирования в 70%-ном формамиде приведена в табл. 13. После центрифугирования РНК осаждают из соответствующих фракций этанолом.

Гель-электрофорез. Электрофорез в препаративных ПААГ или агарозных гелях в денатурирующих условиях, например в присутствии метилртутьгидроксида, также широко используется для фракционирования различных классов РНК. С его помощью получают большие количества чистых мРНК, способных

Таблица 13. Фракционирование РНК в градиенте плотности сахарозы в денатурирующих условиях

1. Приготовьте градиенты сахарозы 5—20% в 3 мМ ЭДТА, 70%-ном формамиде, 3 мМ трис-HCl, pH 7,9[1].
2. Растворите РНК в том же буфере, наслоите ее на градиент и отцентрифугируйте 20 ч при 186 000*g* при 25 °С[2] в роторе Beckman SW41 или эквивалентном ему.
3. После центрифугирования пропустите градиент через проточный денситометр, регистрирующий поглощение при 260 нм. Раскапайте градиент на фракцин. Осадите РНК в нужных фракциях, добавив 2,5 объема этанола и NaCl до 0,2 М. Оставьте на ночь при —20 °С и отцентрифугируйте осадок РНК.

[1] Можно использовать и градиенты, приготовленные на других буферных растворах, содержащих, например, 5мМ ЭДТА, pH 7,4, 0,5%-ный ДСН или 10 мМ LiCl, 1 мМ ЭДТА, 99%-ный ДМСО вместо 70%-ного формамида.
[2] Оптимальное время центрифугирования зависит от размера интересующей исследователя РНК.

к активной трансляции. Подобные методы были подробно рассмотрены в литературе [27] и поэтому здесь обсуждаться не будут.

2.6.2 Фракционирование по нуклеотидной последовательности

По мере изучения нуклеотидных последовательностей мРНК эукариотических клеток появлялись методы фракционирования мРНК на основании особенностей их первичной структуры.

Аффинная хроматография на oligo(dT)-целлюлозе. Этот метод чаще всего используют для очистки молекул мРНК, имеющих на 3′-конце цепочку poly(A), т. е. полиаденилированных poly(A)$^+$-мРНК. Процедуры, которые используются в разных лабораториях, очень сходны и различаются лишь в деталях. Обычно до 10 мг суммарной РНК медленно наносят на небольшую колонку (1—2 мл) при комнатной температуре в буфере, содержащем 0,5 М NaCl или KCl, 1 мМ ЭДТА, 0,1% ДСН[1], 10 мМ трис-HCl, pH 7,5, колонку промывают большим объемом этого раствора (табл. 14). РНК, не имеющие poly(A) (в основном рРНК и тРНК), не связываются с oligo(dT)-целлюлозой и проходят через колонку. Poly(A)$^+$-мРНК связывается с колонкой, и ее можно затем элюировать, понижая ионную силу элюента. Обычно для более полного удаления примесей рРНК poly(A)$^+$-мРНК пропускают через колонку еще раз. Затем ее осаждают этанолом в присутствии 0,3 М ацетата натрия (pH 5,2) (табл. 14). Кристосек и др. [28] показали, что можно вызвать диссоциацию полисом в буфере, содержащем ДСН,

[1] Если в растворе присутствуют ионы калия, вместо ДСН следует брать N-лаурилсаркозинат натрия. — *Прим. перев.*

Таблица 14. Очистка матричной РНК хроматографией на oligo(dT)-целлюлозе[1]

1. Суспендируйте oligo(dT)-целлюлозу в стерильном буфере для нанесения с высокой ионной силой:
   0,5 М NaCl (или KCl)
   1 мМ ЭДТА
   0,1% ДСН
   10 мМ трис-HCl, pH 7,5
2. Набейте колонку объемом 1—2 мл (стерильный шприц или пастеровская пипетка) этой oligo(dT)-целлюлозой. Промойте ее следующими растворами (в указанном порядке):
   1) H_2O
   2) 0,1 М NaOH, 5 мМ ЭДТА
   3) H_2O
   Продолжайте отмывку oligo(dT)-целлюлозы водой, пока pH не станет близким к нейтральному.
3. Снова уравновесьте колонку стерильным буфером для нанесения.
4. Прогрейте раствор РНК в воде 5 мин при 65 °С. Добавьте равный объем двукратного буфера для нанесения, охладите и нанесите на колонку.
5. Соберите РНК, не связавшуюся с колонкой, прогрейте при 65 °С и еще раз нанесите на колонку, как в п. 4.
6. Промывайте колонку буфером для нанесения (не менее 5 объемов колонки), пока A_{260} вытекающего раствора не упадет практически до нуля.
7. Элюируйте poly(A)$^+$-РНК стерильным буфером с низкой ионной силой:
   1 мМ ЭДТА
   0,05% ДСН
   10 мМ трис-HCl, pH 7,5
8. Доведите концентрацию соли в растворе poly(A)$^+$-РНК снова до 0,5 М NaCl или KCl и повторите операции пп. 3—7.
9. Добавьте к poly(A)$^+$-РНК ацетат натрия, pH 5,2, до концентрации 0,3 М и осадите РНК 2,5 объемами этанола в течение ночи при —20 °С.
10. Соберите РНК центрифугированием (10 000g, 10 мин), промойте осадок 70%-ным этанолом, высушите и растворите в стерильной воде. Храните при —70 °С.
11. Регенерируйте oligo(dT)-целлюлозу, промыв ее 0,1 М NaOH, 5 мМ ЭДТА, затем водой и наконец буфером для нанесения, как указано в пп. 2 и 3.

[1] Можно модифицировать процедуру так, чтобы проводить ее не на колонке, а в пробирке. Для этого берут 0,5 г oligo(dT)-целлюлозы (сухой вес) на 1 мг РНК. Сорбент со связанной РНК многократно центрифугируют в буфере для нанесения, чтобы отмыть от несвязавшейся РНК, а затем элюируют РНК буфером с низкой ионной силой. Этот метод удобен, когда приходится обрабатывать одновременно много образцов.

и этот раствор непосредственно фракционировать на oligo(dT)-целлюлозе, минуя депротеинизацию.

Аффинная хроматография на poly(U)-сефарозе. Молекулы мРНК, имеющие короткие последовательности poly(A) на 3′-концах (менее 20 нуклеотидов), плохо связываются с oligo(dT)-целлюлозой, но их удается задержать на poly(U)-сефарозе, несущей более длинные цепочки аффинного лиганда. В этом случае для элюции poly(A)$^+$-мРНК нужны более сильные денатурирующие условия (70—90% формамида) (табл. 15). мРНК можно также элюировать с таких аффинных колонок, не пони-

Таблица 15. Очистка матричной РНК хроматографией на poly(U)-сефарозе [30]

1. Суспендируйте poly(U)-сефарозу в стерильном буфере для элюции:
   10 мМ ЭДТА
   0,2% саркозила
   90% формамида
   10 мМ фосфат калия, pH 7,5
2. Перенесите суспензию в стерильный шприц, чтобы получить колонку размером 0,5×2,0 см.
3. Промойте колонку 3 мл буфера для элюции.
4. Промойте колонку 3 мл стерильного буфера для нанесения:
   0,5 М NaCl
   10 мМ ЭДТА
   25% формамида
   50 мМ трис-HCl, pH 7,5
5. Растворите РНК в буфере для нанесения и нанесите на колонку.
6. Проэлюируйте несвязавшуюся РНК тремя порциями буфера для нанесения по 1 мл.
7. Проэлюируйте связавшуюся poly(A)$^+$-РНК шестью порциями буфера для элюции по 0,25 мл (п. 1).
8. Осадите РНК этанолом, как описано в табл. 14, пп. 9 и 10.
9. Регенерируйте poly(U)-сефарозу, уравновесив ее буфером для нанесения (п. 4).

жая ионную силу, а повышая температуру [30, 31]. Этот подход получил дальнейшее развитие для фракционирования poly(A)$^+$-мРНК по длине poly(A) на основе элюции различных фракций при ступенчатом повышении температуры [29]. Сходный метод был использован для хроматографии частиц мРНП на oligo(dT)-целлюлозе [32].

Очистка poly(A)$^+$-мРНК другими методами. Присутствие poly(A)-последовательностей в мРНК сообщает им ряд новых свойств, которые можно использовать для их выделения. Если проводить фенольную экстракцию при нейтральном pH, poly(A)$^+$-мРНК переходят в фенольную фазу, а при повторной экстракции при pH 9,0 их можно перевести в водную фазу [33]. Кроме того, они связываются с немодифицированной целлюлозой [34] и с фильтрами типа Millipore, сделанными из эфиров целлюлозы, в 0,5 М KCl [35]. Связавшуюся с фильтрами и целлюлозой фракцию можно затем элюировать 0,05%-ным ДСН при низкой ионной силе. Однако ни один из этих подходов не обладает такой специфичностью, как аффинная хроматография на oligo(dT)-целлюлозе или poly(U)-сефарозе.

Выделение poly(A)$^-$-мРНК. Выделение клеточных мРНК, не содержащих 3′-концевых poly(A)-последовательностей, представляет собой более сложную проблему. Гринберг [36] описал метод, основанный на различии в плавучей плотности диссоциированных в присутствии ЭДТА рибосом и мРНП-частиц в градиенте сульфата цезия, содержащем 15% ДМСО. Фракцию

мРНП депротеинизируют и разделяют на популяции poly(A)$^+$- и poly(A)$^-$-мРНК, как описано выше.

Выделение индивидуальных мРНК. Если имеется ДНК, комплементарная последовательности индивидуальной мРНК, то можно выделить мРНК методом селективной гибридизации. ДНК иммобилизуют на нитроцеллюлозе или химически активированной бумаге и затем используют для связывания индивидуальной мРНК. После элюции ее добавляют в систему in vitro, где она транслируется с образованием определенных полипептидных продуктов [37, 38]. Этот метод имеет большие перспективы и получит широкое распространение, когда клонированные ДНК станут более доступны в качестве гибридизационных зондов. Одна из методик выделения мРНК этим методом описана в гл. 2, табл. 4.

2.7. Ингибиторы рибонуклеаз

В настоящей главе уже рассмотрен ряд методов подавления рибонуклеазной активности (разд. 2.1—2.4 и табл. 1). В дополнение к этим общим подходам существует ряд специальных способов ингибирования рибонуклеазной активности при выделении мРНК, которые вкратце суммированы ниже.

Гепарин. Этот сульфатированный полисахарид широко используется в качестве ингибитора рибонуклеаз. Он адсорбирует нуклеазы и конкурентно ингибирует их. Добавление этого соединения в буферы в концентрации 1 мг/мл при получении субклеточных фракций и полисом может существенно улучшить выход и трансляционную активность очищенной мРНК. Однако гепарин следует удалить из препарата РНК перед проверкой в системе трансляции, так как он является ингибитором инициации полипептидной цепи. Для удаления гепарина спиртовой осадок РНК промывают 3 М ацетатом натрия или 2 М хлористым литием. Другие полианионы, например поливинилсульфат, действуют подобно гепарину [39], видимо связывая рибонуклеазы и конкурируя таким образом с РНК. В ранних работах для адсорбции рибонуклеаз использовали диатомовую землю (бентонит), но она не ингибирует их полностью.

Белки — ингибиторы рибонуклеаз. Из печени крысы и из плаценты человека были выделены и очищены белки, которые связываются с рибонуклеазой и обратимо ее ингибируют. Ингибитор из плаценты имеется в продаже (табл. 2). Он применяется не только для предотвращения деградации полисом при получении клеточных субфракций и деградации РНК во время ее выделения (табл. 4); его добавляют также вместе с экзогенной мРНК в бесклеточную систему трансляции из зародышей пшеницы для увеличения выхода продуктов трансляции (гл. 9, разд. 3.2) [40].

Протеиназа К. Фермент протеиназа К полезен тем, что функционирует в присутствии ДСН и быстро инактивирует нуклеазы из многих источников. Его рекомендуется применять также для уменьшения белковой интерфазы, образующейся при фенольной экстракции (табл. 4).

Другие агенты, подавляющие рибонуклеазную активность. В некоторых случаях хороший эффект дают комплексы ванадия с рибонуклеозидами: эти комплексы связываются с рибонуклеазами и инактивируют их (табл. 4). В других случаях защитить полисомы от деградации во время выделения может простая мера предосторожности — увеличение концентрации Mg^{2+} до 50 мМ и выше [41].

Благодарности

Я благодарен за финансовую поддержку, полученную от Общества борьбы с раком.

Литература

1. *Lodish H. F.* Annu. Rev. Biochem., 45, 39 (1976).
2. *Moldave K., Grossman L., eds.* Methods in Enzymology, vol. 60, published by Academic Press, Inc., New York and London, 1979.
3. *Ehrenberg L., Fedorcsak I., Solymosy F.* In: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, vol. 16, Cohn W. E. (ed.), Academic Press, Inc., New York and London, p. 189, 1976.
4. *Taylor J. M.* Annu. Rev. Biochem., 48, 681 (1979).
5. *Verma D. P. S., Maclachlan G. A., Byrne H., Ewings D.* J. Biol. Chem., 250, 1019 (1975).
6. *Shore G. C., Tata J. R.* J. Cell Biol., 72, 726 (1977).
7. *Favaloro J., Treisman R., Kamen R.* In: Methods in Enzymology, vol. 65, Grossman L. and Moldave K. (eds.), Academic Press, New York and London, p. 718, 1980.
8. *Chirgwin J. M., Przybyla A. E., MacDonald R. J., Rutter W. J.* Biochemistry (Wash.), 18, 5294 (1979).
9. *Raymond Y., Shore G. C.* J. Biol. Chem., 254, 9335 (1979).
10. *Auffray C., Rougeon F.* Eur. J. Biochem., 107, 303 (1979).
11. *Buckingham M. E., Cohen A., Gros F.* J. Mol. Biol., 103, 611 (1976).
12. *Palmiter R. D.* Biochemistry (Wash.), 13, 3606 (1974).
13. *Ramsey J. C., Steele W. J.* Biochemistry (Wash.), 15, 1704 (1976).
14. *Dissous C., Lempereur C., Verwaerde C., Krembel J.* Eur. J. Biochem., 83, 17 (1978).
15. *Adesnik M., Maschio F.* Eur. J. Biochem., 114, 271 (1981).
16. *Mechler B., Rabbitts T. H.* J. Cell Biol., 88, 29 (1981).
17. *Mechler B.* J. Cell. Biol., 88, 37 (1981).
18. *Mechler B.* J. Cell. Biol., 88, 42 (1981).
19. *Schochetman G., Perry R. P.* J. Mol. Biol., 63, 591 (1972).
20. *Nabeshima Y.-I., Imai K., Ogata K.* Biochim. Biophys. Acta, 564, 105 (1979).
21. *Schechter I.* Biochemistry (Wash.), 13, 1875 (1974).
22. *Shapiro D. J., Taylor J. M., McKnight G. S., Palacios R., Gonzalez C., Kiely M. L., Schimke R. T.* J. Biol. Chem., 249, 3665 (1974).
23. *Shapiro D. J., Schimke R. T.* J. Biol. Chem., 250, 1759 (1975).

24. *Payvar F., Schimke R. T.* Eur. J. Biochem., **101**, 271 (1979).
25. *Palacios R., Sullivan D., Summers N. M., Kiely M. L., Schimke R. T.* J. Biol. Chem., **248**, 540 (1973).
26. *Villa-Komaroff L., McDowell M., Baltimore D., Lodish H. F.* In: Methods in Enzymology, vol. 30, Moldave K. and Grossman L. (eds.), Academic Press, Inc., New York and London, p. 709, 1974.
27. *Rickwood D., Hames B. D., eds.* Gel Electrophoresis of Nucleic Acids, published by IRL Press Ltd., Oxford and Washington, DC, 1982.
28. *Krystosek A., Cawthon M. L., Kabat D.* J. Biol. Chem., **250**, 6077 (1975).
29. *Lindberg U., Persson T.* Eur. J. Biochem., **31**, 246 (1972).
30. *Firtel R. A., Lodish H. F.* J. Mol. Biol., **79**, 295 (1973).
31. *Rhoads R. E.* J. Biol. Chem., **250**, 8088 (1975).
32. *Jain S. K., Pluskal M. G., Sarkar S.* FEBS Lett., **97**, 84 (1979).
33. *Brawerman G., Mendecki J., Lee S. Y.* Biochemistry (Wash.), **11**, 637 (1972).
34. *Schutz G., Beato M., Feigelson P.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **49**, 680 (1972).
35. *Gorski J., Morrison M. R., Merkel C. G., Lingrel J. B.* J. Mol. Biol., **86**, 363 (1974).
36. *Greenberg J. R.* Biochemistry (Wash.), **15**, 3516 (1976).
37. *Ricciardi R. P., Miller J. S., Roberts B. E.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 4927 (1979).
38. *Bedard L.* J. Virol., **46**, 656 (1983).
39. *Fellig J., Wiley C. E.* Arch. Biochem. Biophys., **85**, 313 (1959).
40. *Scheele G., Blackburn P.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 4898 (1979).
41. *Morton B., Nwizu C., Henshaw E. C., Hirsch C. A., Hiatt H. H.* Biochim. Biophys. Acta, **395**, 28 (1975).

ТРАНСЛЯЦИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ МАТРИЧНЫХ РНК В БЕСКЛЕТОЧНЫХ ЭКСТРАКТАХ

М. Клемепс

1. Введение

В последние годы для трансляции эукариотических матричных РНК использовалось несколько бесклеточных белоксинтезирующих систем. Наибольшее распространение получили лизаты ретикулоцитов кролика и экстракты зародышей пшеницы. Они имеют ряд преимуществ перед другими системами, и их легко получить, если только организовать лабораторную работу таким образом, чтобы предотвратить загрязнение рибонуклеазами и другими агентами. Кроме этих систем использовались также экстракты многих других клеточных культур и перевиваемых клеток асцитных опухолей, способные инициировать трансляцию и давать полноразмерные продукты трансляции. В этой главе рассмотрены приготовление и свойства таких эукариотических систем трансляции мРНК. Кроме того, в ней описана процедура обработки препаратов микрококковой нуклеазой для подавления белкового синтеза, направляемого эндогенными мРНК, рассмотрены разнообразные способы анализа продуктов трансляции экзогенной мРНК и обсуждено использование бесклеточных систем для исследования превращений первичных продуктов трансляции и механизмов регуляции синтеза белка. Прокариотические системы трансляции мы не рассматривали, так как в настоящее время для изучения множества аспектов экспрессии бактериальных и фаговых генов обычно применяют сопряженные системы транскрипции — трансляции (гл. 7).

2. Лизат ретикулоцитов

Хотя лизат ретикулоцитов можно приобрести у ряда фирм (табл. 1) и эти препараты очень удобны и уже оптимизированы в отношении трансляции мРНК (разд. 2.2), это весьма дорогой путь получения лизата. Во время написания статьи его цена составляла не менее 24 ф. ст. за 1 мл, а общая стоимость лизата, который можно получить из одного кролика, достигала примерно 500 ф. ст. Поэтому из соображений экономии безусловно целесообразно получать лизат самим.

Таблица 1. Фирмы, поставляющие реактивы для исследования трансляции в бесклеточных системах

Готовые системы трансляции	
Лизат ретикулоцитов	Collaborative Research
Лизат ретикулоцитов, обработанный нуклеазой	Amersham BRL Collaborative Research NEN P and S Biochemicals
Бесклеточная система из зародышей пшеницы	BRL
Система из зародышей пшеницы, обработанная нуклеазой	BRL
Реактивы	
Препарат аминоацил-тРНК — синтетаз *E. coli*	Sigma
Эдеин	Calbiochem.
Глобиновая мРНК	BRL
Препарат тРНК из клеток млекопитающих	Boehringer
Микрококковая нуклеаза	Boehringer P-L Biochemicals
Препарат микросомных мембран	NEN
РНК ВТМ	Amersham

2.1. Приготовление и хранение лизата

Лизат ретикулоцитов получают путем лизиса эритроцитов кроликов, выздоравливающих после экспериментальной анемии. Рекомендуемая методика описана в табл. 2. Для подготовки животных было предложено много схем. Одна из них, с помощью которой мы получаем надежные результаты, состоит в следующем. У кроликов-самцов массой 2—2,5 кг вызывают анемию путем ежедневного введения (подкожно) в течение 4 дней 25 мг ацетилфенилгидразина (свежеприготовленный водный раствор, 10 мг/мл). Кровь берут спустя 5 дней (период реконвалесценции) (табл. 2). При использовании этой схемы гематокрит возрастает, в результате от каждого кролика можно получить больше эритроцитов и, следовательно, больше лизата. При этом проходит достаточно времени, чтобы ацетилфенилгидразин и продукты его метаболизма исчезли из крови. Для экономии времени имеет смысл работать сразу с несколькими кроликами. Нужно следить, чтобы на протяжении всего эксперимента кролики были здоровыми (не считая анемии).

На 9-е сутки после первой инъекции кроликов наркотизируют путем введения нембутала с гепарином в ушную вену (табл. 2). Если немного выбрить шерсть, вена хорошо видна на краю уха. Чтобы сделать инъекцию, нужен некоторый опыт;

Таблица 2. Получение лизата ретикулоцитов

1. Отберите несколько кроликов и вводите каждому подкожно по 2,5 мл ацетилфенилгидразина (10 мг/мл в воде) ежедневно в течение 4 дней.
2. Через 5 сут отберите у одного кролика кровь, как описано ниже.
3. Инъецируйте в ушную вену 1,0—1,5 мл нембутала и 1 мл 1%-го гепарина в 0,9%-ном NaCl. Убедитесь в полной наркотизации животного.
4. Отберите кровь путем пункции сердца и храните ее во льду.
5. Отцентрифугируйте кровь в бакет-роторе 10 мин при 1200*g* и 4 °С.
6. Отсосите супернатант и ресуспендируйте клетки с помощью стеклянной палочки в 200 мл следующего буфера:
   0,14 М NaCl
   5 мМ KCl
   5 мМ ацетат магния
   5 мМ глюкоза
   5 мМ HEPES (pH следует довести раствором KOH до 7,2)
7. Отцентрифугируйте клетки, как указано в п. 5.
8. Повторите этапы 6 и 7 еще дважды. Последний раз отцентрифугируйте клетки 15 мин при 1600*g*.
9. Отсосите супернатант, измерьте объем плотного клеточного осадка и лизируйте клетки добавлением 1,0—1,5 объемов холодного бидистиллята. Тщательно перемешайте.
10. Отцентрифугируйте 20 мин при 21 000*g* и 4 °С в пробирках из стекла Corex или в прозрачных пластиковых пробирках[1].
11. Отберите супернатант, стараясь не загрязнить его частицами осадка (стромы). Разделите лизат на аликвоты по 1 мл, быстро заморозьте и храните в жидком азоте.

[1] Прозрачные пробирки нужны для того, чтобы легче было отобрать чистый супернатант на этапе 11.

ее лучше проводить с ассистентом, который будет крепко держать кролика. Наркоз наступает быстро, при этом сердце должно сокращаться нормально. Наркотизированное животное кладут на спину и берут кровь путем пункции сердца, используя толстую иглу, присоединенную к гибкому пластиковому шлангу. Сердце должно достаточно быстро выталкивать кровь. Если этого не происходит или сердце останавливается, кровь все-таки можно собрать. Для этого нужно вскрыть грудную клетку, надрезать аорту и отсосать кровь шприцем. Она не свернется, поскольку при инъекции был введен гепарин. Собранную кровь следует держать во льду. Относительная активность лизатов ретикулоцитов, полученных от различных кроликов, часто сильно колеблется. Поэтому рекомендуется хранить кровь, взятую у разных животных, по отдельности на тот случай, если наименее активные препараты содержат ингибиторы, которые будут подавлять активность лучших лизатов. Выход крови должен быть до 100 мл от одного животного. Чтобы подсчитать число ретикулоцитов, смешивают несколько капель крови с 1%-ным бриллиантовым крезиловым голубым в физиологическом растворе и изучают мазок под микроскопом с иммерсионным объективом. Правда, опыт показывает, что число ретикулоцитов

не всегда коррелирует с трансляционной активностью полученного лизата.

Клетки собирают центрифугированием, промывают и лизируют холодной водой (табл. 2). После центрифугирования для удаления стромы лизат можно либо сразу заморозить аликвотами по 1 мл в жидком азоте и в таком виде хранить, либо вначале обработать микрококковой нуклеазой (разд. 2.4). При хранении в жидком азоте лизаты ретикулоцитов сохраняют свою активность очень долго (не менее 2 лет). При —70 °С их можно хранить несколько месяцев, но хранение при —20 °С не рекомендуется. Прежде чем транспортировать лизаты в сухом льду, их следует заплавить в пластиковые пакеты, чтобы они не потеряли активность под действием высокой концентрации двуокиси углерода. После того как лизат разморожен, его лучше снова не замораживать, хотя один раз это можно сделать без большой потери активности.

2.2. Оптимизация активности

Каждый из приготовленных лизатов следует охарактеризовать по белоксинтезирующей активности в зависимости от концентрации гемина — соединения, предотвращающего активацию репрессора трансляции в этой системе [1]. Такой эксперимент не только показывает, каков уровень включения аминокислот при трансляции эндогенной мРНК в стандартных условиях, но и дает информацию о том, в какой степени экстракт стимулируется геминином и какова оптимальная концентрация гемина, дающая этот эффект. Вообще говоря, у наиболее активных лизатов наблюдается наибольшая реакция на добавление гемина.

Исходный раствор гемина трудно приготовить и хранить, если не следовать правильной методике. Растворы остаются стабильными только в 90%-ном этиленгликоле, забуференном трис-HCl (pH 7,8). В табл. 3 приведена методика приготовления раствора. Чтобы определить оптимальную концентрацию гемина, лизат инкубируют с различными количествами этого раствора вплоть до конечной концентрации 40 мкМ в условиях, когда может идти синтез белка (разд. 2.3). В качестве меченой

Таблица 3. Приготовление исходного раствора гемина

1. Растворите 6,5 мг гемина в 0,25 мл 1 М КОН.
2. Добавьте следующие растворы в указанном порядке, перемешивая смесь после каждого добавления:
   0,5 мл 0,2 М трис-HCl, pH 7,8
   8,9 мл этиленгликоля
   0,25 мл 1 М HCl
3. Храните раствор при —20 °С. Конечная концентрация гемина 1 мМ.

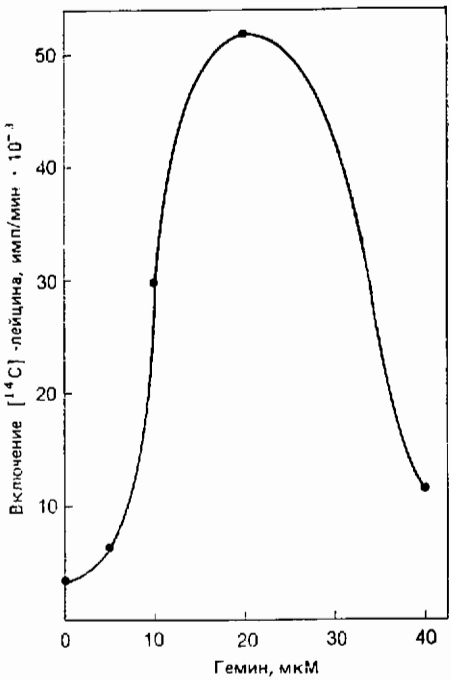


Рис. 1. Определение оптимальной концентрации гемина для синтеза белка в лизате ретикулоцитов. Свежеприготовленный лизат инкубировали в присутствии указанных концентраций гемина 60 мин при 30 °С в условиях, указанных в табл. 4. Для определения включившейся в белки метки отбирали аликвоты объемом 20 мкл и определяли их радиоактивность, как описано в табл. 6.

аминокислоты берут [^{14}C]-лейцин. После инкубации в течение 60 мин при 30 °С определяют степень включения радиоактивного лейцина. В большинстве случаев в хороших лизатах наблюдалось примерно 10-кратное увеличение скорости трансляции в присутствии гемина при оптимальной его концентрации 10—20 мкМ. На рис. 1 приведен результат типичного опыта. Вычисленная скорость включения добавленного лейцина в оптимальных условиях составляет в хороших, не обработанных нуклеазой лизатах около 50 пмоль/мин в реакционной смеси объемом 20 мкл, хотя истинная скорость выше, так как сам лизат содержит значительное количество лейцина.

2.3. Условия инкубации для синтеза белка

Лизат ретикулоцитов содержит в значительном количестве эндогенные мРНК (в основном кодирующие α- и β-глобины), которые могут транслироваться в благоприятных условиях инкубации. В таком режиме лизат ретикулоцитов используется в настоящее время главным образом только для изучения механизма синтеза белка (разд. 7.1). Для трансляции экзогенных мРНК, выделенных из других источников (гл. 8), лизат обычно

Таблица 4. Условия инкубации для лизата ретикулоцитов

Исходные растворы

Смесь солей, аминокислот и соединений — источников энергии (5-кратная)[1]:
- 0,375 М KCl[2]
- 10 мМ ацетат магния
- 15 мМ глюкоза
- 0,25 — 1,0 мМ аминокислоты
- 20 мкКи/мл [^{14}C]-лейцина (20—30 мКи/ммоль) *или* до 2,5 мКи/мл [^{35}S]-метионина (~1200 Ки/ммоль)
- 5 мМ ATP
- 1 мМ GTP
- 50 мМ трис-HCl, pH 7,6

Креатинфосфат — креатинфосфокиназа (10-кратный исходный раствор)[3]:
- 70 мМ креатинфосфат
- 10 мг/мл креатинфосфокиназы

Реакционная смесь

Для составления каждой инкубационной смеси (конечный объем 100 мкл) аккуратно смешайте во льду в стерильной микроцентрифужной пробирке следующие компоненты:
- 50 мкл лизата ретикулоцитов (оттаивайте лизат непосредственно перед использованием в присутствии гемина в концентрации, в два раза превышающей оптимальную);
- 20 мкл смеси солей, аминокислот и соединений — источников энергии (5-кратный раствор);
- 10 мкл креатинфосфата — креатинфосфокиназы (10-кратный исходный раствор);
- 20 мкл воды или других компонентов (например, экзогенной мРНК, если требуется, до конечной концентрации 5—100 мкг/мл).

Инкубируйте при 30 °С.

[1] Может храниться длительное время при —20 °С (если используется [^{14}C]-лейцин) или при —70 °С (если используется [^{35}S]-метионин).

[2] Если вместо хлористого калия использовать ацетат калия, можно создать в системе трансляции более высокую концентрацию ионов K+, необходимую для трансляции некоторых экзогенных мРНК; повышенная концентрация хлорид-иона ингибирует инициацию.

[3] Смесь готовят непосредственно перед использованием.

перед использованием обрабатывают микрококковой нуклеазой (разд. 2.4), чтобы понизить трансляцию эндогенных глобиновых мРНК. Описанные ниже условия инкубации оптимальны как для трансляции *эндогенной* мРНК, так и для трансляции (после небольших модификаций; см. разд. 2.4.2) *экзогенных* мРНК в лизате, обработанном нуклеазой.

Когда лизат ретикулоцитов используется в качестве бесклеточной тест-системы синтеза белка, важно, чтобы концентрация самого лизата была как можно выше; при этом обеспечивается максимальная интенсивность трансляции. После определения оптимальной концентрации гемина (разд. 2.2) желательно оттаивать замороженный лизат сразу в присутствии двукратной концентрации гемина; при проведении реакции лизат должен составлять 50% конечного объема реакционной смеси. В табл. 4

Таблица 5. Конечные концентрации компонентов в инкубационной смеси с лизатом ретикулоцитов

75 мМ KCl[1]
2мМ ацетат магния
3 мМ глюкоза
50—200 мкМ аминокислóты
4 мкКи/мл [^{14}C]-лейцина (или до 500 мкКи/мл [^{35}S]-метионина)
1 мМ ATP
0,2 мМ GTP
10 мМ трис-HCl, pH 7,6
7 мМ креатинфосфат
1 мг/мл креатинфосфокиназы
10—20 мкМ гемин
До 100 мкг/мл мРНК[2]

[1] См. вторую сноску к табл. 4.
[2] Если исследуется трансляция экзогенной мРНК.

приведен состав растворов для реакции и указан удобный порядок внесения отдельных компонентов. Конечные концентрации всех компонентов даны в табл. 5; кроме того, с лизатом вносится некоторое количество ионов K^+ (до 20 мМ) и Mg^{2+} (1 мМ). Некоторые исследователи не включают в смесь солей, аминокислот и источников энергии (табл. 4) ATP и GTP, поскольку они также присутствуют в лизате. В этом случае уменьшают и конечную концентрацию ацетата магния (до 0,5 мМ).

Если необходимо транслировать *экзогенные* мРНК, их добавляют в лизат ретикулоцитов (обычно после обработки нуклеазой: см. разд. 2.4) вместо такого же объема воды (табл. 4) до конечной концентрации 5—100 мкг/мл. В этом случае оптимальные концентрации солей могут отличаться от указанных в табл. 5, и их следует определить в предварительных экспериментах.

Инкубацию удобно проводить в микроцентрифужных пробирках одноразового пользования, применяя для добавления компонентов и отбора проб автоматические микропипетки (типа Finn pipettes) или микрокапилляры (типа Drummond). Важно тщательно перемешивать содержимое пробирок (не вспенивая его), так как лизат имеет очень высокую плотность. До начала инкубации все компоненты следует держать во льду. Для длительного синтеза белка инкубацию лучше всего проводить при 30 °C. В оптимальных условиях включение аминокислот нарастает линейно в течение по крайней мере 60 мин. Если включение перестает нарастать раньше этого времени, стоит проверить, какая часть меченой аминокислоты включилась, так как в случае очень активных лизатов может быстро исчерпаться запас аминокислот в среде, если их не добавить в достаточном количестве. Таким образом, в этой системе использование пред-

Таблица 6. Определение включения аминокислот в системе лизата ретикулоцитов[1]

Метод нанесения на бумажные фильтры

1. Нанесите аликвоты (2—10 мкл) каждой инкубационной смеси на отдельные пронумерованные круглые фильтры Whatman № 1 диаметром 2,5 см, разложенные на листе алюминиевой фольги.
2. Поместите фильтры в стакан с 5%-ной ТХУ, охлажденной во льду, и промойте их, осторожно помешивая в течение 15 мин.
3. Перенесите фильтры в 5%-ную ТХУ, нагретую до 90 °С, и проинкубируйте 15 мин при этой температуре, чтобы гидролизовать аминоацилированные тРНК.
4. Перенесите фильтры в стакан со свежей порцией 5%-ной ТХУ при комнатной температуре и промойте их, осторожно помешивая в течение 15 мин.
5. Промойте фильтры абсолютным этанолом, а затем ацетоном, осторожно помешивая в каждом растворителе в течение 1 мин.
6. Просушите фильтры при комнатной температуре на алюминиевой фольге.
7. Налейте на каждый фильтр 40 мкл 10%-ной (вес/объем) перекиси водорода и оставьте при комнатной температуре примерно на 1 ч. При этом пробы обесцвечиваются, и тем самым предотвращается тушение флуоресценции при просчете радиоактивности в сцинтилляторе.
8. За время инкубации перекись водорода высохнет. Поместите каждый фильтр во флакон или в специальный вкладыш и просчитайте радиоактивность проб в каком-либо толуольном сцинтилляторе.

Метод фильтрования

1. Перенесите аликвоту (2—10 мкл) каждой реакционной смеси в 0,5 мл воды и добавьте 0,5 мл 1,0 М NaOH, чтобы гидролизовать аминоацил-тРНК, и 50 мкл 30%-ной (вес/объем) перекиси водорода (чтобы обесцветить образцы).
2. Как только образцы обесцветятся, добавьте 0,25 мл 50%-ной ТХУ до конечной концентрации 10%. Перемешайте и перенесите образцы в лед на 30 мин, чтобы осадить белки.
3. Профильтруйте каждую пробу через стекловолокнистый фильтр GF/C диаметром 2,5 см с помощью приспособления для одновременного нанесения нескольких образцов, присоединенного к вакууму.
4. Промойте каждый фильтр, лежащий на подложке приспособления для фильтрования, тремя порциями 5%-ной ТХУ по 10 мл.
5. Промойте каждый фильтр 10 мл абсолютного этанола.
6. Просушите фильтры под инфракрасной лампой и определите радиоактивность в толуольном сцинтилляторе.

[1] Эти методы можно использовать и для определения включения аминокислот в других системах трансляции, но при этом нет необходимости проводить обесцвечивание перекисью водорода.

шественников с высокой удельной радиоактивностью в низкой концентрации не всегда предпочтительно, хотя эта проблема чаще возникает с меченым лейцином, чем с [^{35}S]-метионином.

В составе лизата в реакционную смесь обычно вносится метионин в концентрации до 5 мкМ, лейцин в концентрации до 10 мкМ и несколько большее количество других аминокислот. Тем не менее, как правило, лизаты не фракционируют с помощью гель-фильтрации, чтобы понизить концентрацию эндогенных аминокислот, так как при этом будут удалены также

другие низкомолекулярные компоненты — полиамины, фосфаты сахаров и субстраты, обеспечивающие восстановительный потенциал, что сильно нарушит весь белковый синтез. Обратить этот эффект можно, только если добавить все недостающие компоненты в лизат [2]. Сделать это не составляет труда, но нужно будет провести новые эксперименты по оптимизации.

Уровень включения аминокислот по окончании инкубации легко определить следующим образом. Наносят пипеткой небольшие аликвоты (2—10 мкл) на пронумерованные кружки фильтровальной бумаги Whatman № 1 и материал на бумаге осаждают ТХУ (табл. 6). Аминоацилированную тРНК гидролизуют прогреванием кружков в горячей ТХУ, образцы обесцвечивают перекисью водорода и определяют радиоактивность с помощью сцинтилляционного счетчика. Вместо этого некоторые исследователи переносят аликвоту из каждой реакционной смеси в 0,5 мл воды, добавляют NaOH для гидролиза аминоацилированной тРНК и перекись водорода (табл. 6). В этом случае гидролиз аминоацилированной тРНК под действием NaOH и обесцвечивание перекисью водорода происходят одновременно. Белки осаждают добавлением ТХУ, затем фильтруют через стекловолокнистые фильтры и определяют радиоактивность, как описано.

Ориентировочная белоксинтезирующая эндогенная активность лизата после осаждения ТХУ аликвоты объемом 5 мкл из пробы, содержащей 4 мкКи/мл [^{14}C]-лейцина (удельная радиоактивность 20 мКи/ммоль), должна в типичном случае давать 20 000 имп/мин за 60 мин инкубации. При вычислении количества синтезированного белка не забудьте учесть вклад эндогенных аминокислот в окончательную удельную радиоактивность меченого предшественника.

2.4. Обработка микрококковой нуклеазой

Важный шаг в использовании бесклеточных белоксинтезирующих систем для трансляции экзогенных мРНК был сделан в 1976 г., когда Пелхэм и Джексон описали метод удаления эндогенной мРНК с помощью обработки лизатов ретикулоцитов микрококковой нуклеазой [3]. Изящество и простота данного подхода основаны на том, что активность этого фермента (из *Staphylococcus aureus*) полностью зависит от кальция, и поэтому после обработки ее можно подавить добавлением Ca^{2+}-хелатирующего агента ЭГТА. К тому же можно подобрать условия, при которых нуклеаза расщепляет мРНК, не подавляя биологической активности тРНК или рибосом. Таким образом, можно получить бесклеточную систему, в которой фоновое вклю-

чение аминокислот практически подавлено, но которая при этом транслирует добавленную мРНК с почти такой же эффективностью, как необработанная.

2.4.1. Приготовление лизата ретикулоцитов, обработанного нуклеазой

В табл. 7 описана простая процедура получения обработанного нуклеазой лизата ретикулоцитов, зависящего от мРНК. Метод состоит по существу всего из двух этапов. Вначале лизат инкубируют с микрококковой нуклеазой в присутствии 1 мМ $CaCl_2$ в течение 15—20 мин при 20 °С. Затем добавляют ЭГТА до концентрации 2 мМ и переносят смесь в лед. Ее можно либо сразу же использовать для проведения трансляции, либо хранить в аликвотах в жидком азоте. Чтобы предотвратить активацию репрессора трансляции, контролируемую гемом, в реакционную смесь следует добавить гемин (40 мкМ) (разд. 2.2). Впоследствии, когда обработанный нуклеазой лизат ретикулоцитов используют для трансляции in vitro, конечная концентрация гемина составит 20 мкМ, так как при приготовлении реакционной смеси на долю лизата приходится 50% конечного объема (табл. 4). Если оптимальная концентрация гемина для необработанного лизата (разд. 2.2) меньше 20 мкМ, при обработке микрококковой нуклеазой следует добавить соответственно меньше гемина. Во время обработки нуклеазой можно также добавить креатинфосфокиназу, хотя ее присутствие на этой стадии не обязательно. В одной статье [9] сообщается, что для инактивации нуклеазы в клеточном экстракте лучше использовать 120 мкМ тимидин-3′,5′-бисфосфат, чем ЭГТА.

Таблица 7. Получение лизата ретикулоцитов, обработанного микрококковой нуклеазой

1. Добавьте к лизату исходные растворы 0,2 М $CaCl_2$ и 1 мМ гемина (табл. 3) до конечных концентраций 1 мМ и 40 мкМ[1] соответственно.
2. Добавьте микрококковую нуклеазу до концентрации 25—100 ед/мл и проинкубируйте 15—20 мин при 20 °С.
3. Добавьте 0,1 М ЭГТА (pH 7,0) до конечной концентрации 2 мМ и перенесите лизат в лед.
4. Обработанный нуклеазой лизат можно сразу же использовать или заморозить порциями в жидком азоте.

[1] Поскольку при добавлении в реакционную смесь лизат разводится вдвое (табл. 4), конечная концентрация гемина при трансляции in vitro составит 20 мкМ. Если оптимальная концентрация гемина для необработанного лизата (разд. 2.2) меньше 20 мкМ, при обработке нуклеазой следует соответственно снизить концентрацию гемина.

Оптимальная конечная концентрация нуклеазы составляет около 100 ед/мл, но она может колебаться для разных экстрактов и должна быть определена для каждого нового препарата.

Если концентрация низка, не все эндогенные мРНК будут инактивированы и останется высокий фон синтеза белка. Избыток фермента повредит рибосомы и тРНК, и в результате добавление мРНК будет слабее стимулировать включение аминокислот.

2.4.2. Условия реакции для осуществления трансляции экзогенной мРНК

Для трансляции экзогенных мРНК в лизате ретикулоцитов, обработанном нуклеазой, используются практически такие же условия, как в случае необработанного лизата (разд. 2.3) с весьма незначительными модификациями: обычно в инкубационную среду добавляют тРНК (из печени теленка) до концентрации 50 мкг/мл. Это обусловлено не разрушением эндогенной тРНК, а тем, что популяция тРНК ретикулоцитов соответствует аминокислотному составу глобинов кролика и может оказаться не оптимальной для трансляции других мРНК, например мРНК вируса табачной мозаики (ВТМ) [3]. Кроме того, возможно, придется снова оптимизировать систему по концентрации Mg^{2+}, чтобы компенсировать слабую хелатирующую способность избытка ЭГТА по отношению к этому иону.

Лизат ретикулоцитов, обработанный нуклеазой, необычайно чувствителен к низким концентрациям мРНК: трансляция наблюдается при концентрации мРНК всего 0,3 мкг/мл. С другой стороны, некоторые мРНК эффективно транслируются при концентрации до 200 мкг/мл. Для каждого препарата РНК следует построить кривую зависимости включения аминокислот от концентрации мРНК, в том числе и контрольную кривую без добавления мРНК, а также с добавлением определенного количества стандартной мРНК, которая уже охарактеризована в отношении трансляции. Чтобы гарантировать синтез полноразмерных полипептидов, реакционные смеси следует инкубировать до 2 ч при 30 °С. Препараты РНК существенно различаются по способности стимулировать включение аминокислот. Как правило, вирусные РНК и глобиновая мРНК являются хорошими матрицами для лизата ретикулоцитов: при концентрации 5—20 мкг/мл они дают превышение включения над фоном в несколько сотен раз. Клеточные мРНК могут оказаться менее эффективными. И суммарная цитоплазматическая РНК, и выделенная poly $(A)^+$-РНК стимулируют трансляцию. Однако суммарная цитоплазматическая РНК должна использоваться в гораздо более высоких концентрациях (100—200 мкг/мл: см. рис. 2), поскольку бóльшая ее часть приходится на долю рРНК. В пробы можно добавлять большие объемы растворов мРНК при условии, что они содержат не очень много солей (особенно Mg^{2+}). Слишком разведенные растворы (в воде) можно лио-

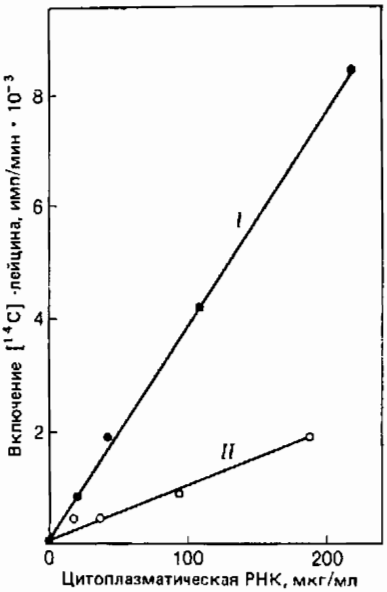


Рис. 2. Трансляция препаратов экзогенной суммарной цитоплазматической РНК в системе лизата ретикулоцитов, обработанного нуклеазой. Суммарную цитоплазматическую РНК выделяли из разведенного в шесть раз лизата ретикулоцитов, как описано в гл. 8, табл. 3. Различные количества РНК транслировали in vitro в условиях, описанных в табл. 4, в течение 60 мин при 30 °С; затем отбирали аликвоты по 10 мкл для определения включившейся в белки радиоактивности, как описано в табл. 6. Приведены данные для двух разных препаратов РНК: *I* — РНК из контрольного лизата, проинкубированного в течение 60 мин; *II* — РНК из лизата, проинкубированного в течение 60 мин с 2′,5′-олигоаденилатом (см. рис. 6). Второй препарат РНК частично деградировал под действием эндонуклеазы, активированной 2′,5′-олигоаденилатом.

филизировать в пробирках для последующей инкубации и растворять РНК прямо в реакционной смеси. Некоторые препараты РНК могут содержать ингибиторы трансляции, например сульфатированные полисахариды или двухцепочечную РНК. Присутствие ингибиторов можно обнаружить, добавляя препараты РНК к инкубационным смесям, содержащим известное количество стандартной, хорошо транслируемой мРНК. Правда, даже если наблюдается низкая стимуляция белкового синтеза при добавлении РНК, стоит все-таки попытаться выявить специфические продукты трансляции с помощью гель-электрофореза или какого-либо другого метода (разд. 5).

2.5. Достоинства и недостатки

Система лизата ретикулоцитов в своем первоначальном виде или после обработки микрококковой нуклеазой в настоящее время, по всей вероятности, является наиболее широко используемой эукариотической бесклеточной белоксинтезирующей системой. Для этого есть ряд причин: прежде всего высокая активность трансляции эндогенных и экзогенных мРНК, относительная легкость приготовления системы и стабильность при хранении. Матричные РНК участвуют во многих циклах белкового синтеза: за 90 мин инкубации каждая активная молекула мРНК успевает транслироваться 40—70 раз, а скорость элон-

гации полипептидной цепи составляет почти 1 аминокислота/с при 26 °С [5].

В противовес этим ценным свойствам следует отметить, что активность лизатов ретикулоцитов практически невозможно предсказать заранее и хорошие лизаты получаются с переменным успехом. Кроме того, они чрезвычайно чувствительны к некоторым ингибиторам, прежде всего к низким концентрациям двухцепочечной РНК и окисленных тиолов, которые иногда присутствуют в компонентах реакционной смеси. Например, некоторые препараты РНК, хорошо транслируемые в системе из зародышей пшеницы (разд. 3), плохо функционируют в системе лизата ретикулоцитов или даже проявляют ингибирующее действие (S. Trevor-Roper, неопубликованные данные, полученные в лаборатории автора). Кроме того, лизат ретикулоцитов может обладать специфическими регуляторными свойствами, например проявлять строгую потребность в гемине, что делает его нетипичной моделью для исследования регуляторных механизмов трансляции.

В качестве бесклеточной системы для трансляции экзогенных эукариотических клеточных и вирусных РНК наиболее широко используется лизат ретикулоцитов, обработанный микрококковой нуклеазой, и такие препараты можно купить у ряда фирм (см. табл. 1). Их используют не только для изучения определенных продуктов трансляции, но и при исследовании конкуренции различных мРНК, их инактивации и при анализе регуляторных аспектов самого процесса синтеза белка. Зависимые от матрицы лизаты ретикулоцитов использовались в сопряженных системах транскрипции — трансляции с вирусными кор-частицами, содержащими эндогенные РНК-полимеразы. Это часто позволяет обнаружить ранние вирусные продукты, которые не так легко выявить в зараженных клетках [6]. Кроме того, в подобных системах возможны посттранскрипционные модификации, в результате которых образуются активные РНК-матрицы, необходимые для исследований. Такой трансляционный анализ можно использовать для выявления кодирующих последовательностей среди продуктов системы транскрипции Мэнли — экстракта целых клеток (гл. 3). В этой системе в качестве матриц применяются клонированные молекулы ДНК — целые или расщепленные ферментом рестрикции.

При всех этих достоинствах важно иметь в виду одну возможную проблему, возникающую при работе с лизатами, обработанными нуклеазой. Было показано, что после ферментативного расщепления в системе остается значительное количество фрагментов мРНК, в том числе последовательности, включающие участки инициации [8]. Следовательно, образование 80S-комплекса инициации *не* полностью зависимо от экзогенной

мРНК, даже если трансляция на инициирующих фрагментах идет слабо. Добавленные мРНК вынуждены конкурировать с этими фрагментами за связывание с рибосомами, и молекулы РНК со слабыми участками инициации могут делать это недостаточно эффективно. Наконец, следует подчеркнуть, что обработка нуклеазой не может совершить чудо. Бесклеточная система трансляции не может быть лучше исходного экстракта, и экстракт с плохо идущей инициацией останется такой же плохой системой после обработки микрококковой нуклеазой.

3. Экстракты зародышей пшеницы

Экстракты зародышей пшеницы — как обработанные микрококковой нуклеазой, так и без такой обработки — имеются в продаже (табл. 1). Как и лизаты ретикулоцитов, они весьма дороги (90 ф. ст. за 1 мл), несмотря на то, что систему из зародышей пшеницы очень легко приготовить (см. работу [9] и разд. 3.1).

3.1. Приготовление и хранение экстрактов

Одно из основных достоинств бесклеточной системы из зародышей пшеницы состоит в доступности исходного материала; подходящие зародыши пшеницы (т. е. не подвергнутые терми-

Таблица 8. Приготовление экстракта зародышей пшеницы

Все процедуры следует проводить при 4 °С.

1. Растирайте зародыши пшеницы в течение 3 мин с равным по массе количеством промытого, автоклавированного песка в холодной ступке в присутствии 4,5 мл буфера для экстракции на 1 г массы зародышей. Буфер для экстракции имеет следующий состав:
   0,1 М KCl
   1 мМ ацетат магния
   2 мМ $CaCl_2$
   6 мМ 2-меркаптоэтанол
   40 мкМ спермидин
   20 мМ HEPES (довести pH до 7,6 раствором KOH)
2. Отцентрифугируйте образовавшуюся пасту 10 мин при 30 000*g*.
3. Отберите *среднюю* часть супернатанта, стараясь не захватить плавающую пленку липидов.
4. Отдиализуйте полученную фракцию супернатанта в проавтоклавированных диализных трубках или пропустите ее через колонку с сефадексом G-25 (грубым) (не менее 5 мл смолы на 1 мл экстракта). В обоих случаях следует уравновесить экстракт следующим раствором:
   0,12 М KCl
   5 мМ ацетат магния
   6 мМ 2-меркаптоэтанол
   40 мкМ спермидин
   20 мМ HEPES (довести pH до 7,6 раствором KOH)
5. Разделите полученный экстракт на аликвоты и храните его при —70 °С или в жидком азоте.

ческой обработке и без добавления каких-либо консервантов) можно купить в большинстве «магазинов здоровой пищи». Правда, иногда возникает необходимость в приготовлении экстракта зародышей из нескольких источников и в сравнении их активности (разд. 3.2), так как и уровень эндогенного включения аминокислот, и степень стимуляции при добавлении мРНК сильно колеблются от партии к партии [10]. Процедура приготовления экстракта подробно описана в табл. 8.

3.2. Условия инкубации для синтеза белка

Оптимальные условия синтеза белка в системе зародышей пшеницы в основном такие же, как для лизата ретикулоцитов (разд. 2.3). Правда, в отличие от лизата ретикулоцитов, эндогенная трансляционная активность системы зародышей пшеницы низка. Поэтому трансляция в ней сильно зависит от добав-

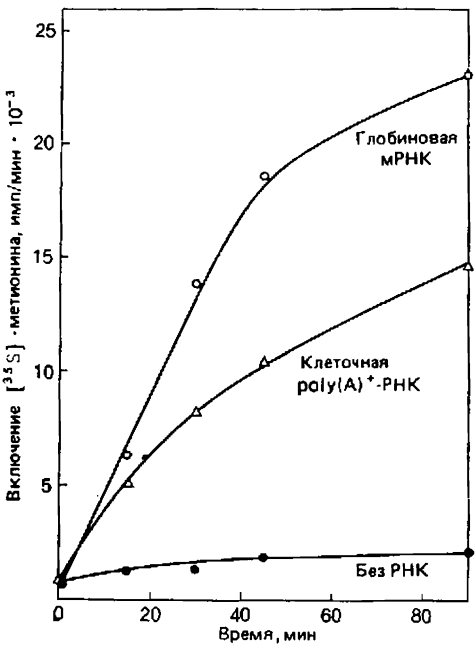


Рис. 3. Трансляция poly(A)⁺-мРНК из ретикулоцитов кролика и эритролейкемических клеток в бесклеточной системе из зародышей пшеницы. Инкубацию проводили при 25 °С в отсутствие РНК или после добавления poly(A⁺)-РНК из эритролейкемических клеток мышей (13 мкг/мл) или глобиновой мРНК (20 мкг/мл). Концентрация [35S]-метионина — 130 мкКи/мл. Через указанные промежутки времени отбирали аликвоты объемом 5 мкл для определения включившейся в белки радиоактивности, как описано в табл. 6.

Таблица 9. Условия инкубации для экстрактов зародышей пшеницы

Исходные растворы

Смесь солей, аминокислот и соединений — источников энергии (5-кратная)[1]:
0,17—0,37 М KCl[2]
5—10 мМ ацетат магния
0,5 мМ аминокислоты без метионина (или без другой аминокислоты, в зависимости от того, какая меченая аминокислота будет использоваться).
До 2,5 мКи/мл [^{35}S]-метионина (~1200 Ки/ммоль) или другой меченой аминокислоты
6,5 мМ ATP
1,25 мМ GTP
12,5 мМ ДТТ
0,19 мМ спермидин
70 мМ HEPES (довести pH до 7,6 раствором KOH)

Креатинфосфат — креатинфосфокиназа (10-кратный исходный раствор):
0,16 М креатинфосфат
7 мг/мл креатинфосфокиназы

Реакционная смесь

Для составления каждой инкубационной смеси (конечный объем 50 мкл) аккуратно смешайте в стерильной микроцентрифужной пробирке во льду следующие компоненты:
15 мкл экстракта зародышей пшеницы (оттаивайте его непосредственно перед использованием)
10 мкл 5-кратного исходного раствора солей, аминокислот и соединений — источников энергии
5 мкл 10-кратного исходного раствора креатинфосфата — креатинфосфокиназы
20 мкл раствора мРНК (до конечной концентрации 20—80 мкг/мл)
Проинкубируйте при 25 °С.

[1] Точные концентрации ионов K^+ и Mg^{2+} зависят от особенностей транслируемой мРНК, и их следует определить экспериментально.
[2] Если вместо хлористого калия использовать ацетат калия, можно создать в системе трансляции более высокую концентрацию ионов K^+, необходимую для трансляции некоторых экзогенных мРНК; повышенные концентрации хлорид-иона ингибируют инициацию.

Таблица 10. Конечные концентрации компонентов в инкубационной смеси с экстрактом зародышей пшеницы

70—110 мМ KCl[1]
2,5—3,5 мМ ацетат магния
100 мкМ аминокислоты, кроме метионина (или другой аминокислоты, в зависимости от того, какой меченый предшественник используется)
До 500 мкКи/мл [^{35}S]-метионина (или другой меченой аминокислоты)
1,3 мМ ATP
0,25 мМ GTP
16 мМ креатинфосфат
0,7 мг/мл креатинфосфокиназы
2,5 мМ ДТТ
50 мкМ спермидин
20 мМ HEPES (pH 7,6)
До 80 мкг/мл мРНК

[1] См. последнюю сноску в табл. 9.

ленной мРНК, так что точные условия проведения эксперимента могут несколько колебаться в зависимости от мРНК. В табл. 9 описана процедура приготовления типичной реакционной смеси объемом 50 мкл, а в табл. 10 указаны конечные концентрации всех компонентов. Концентрация добавленной мРНК обычно составляет 20—80 мкг/мл. Для каждого препарата мРНК необходимо построить кривую зависимости включения от концентрации мРНК при температуре инкубации 25 °С. Включение аминокислот должно нарастать линейно в течение по крайней мере 1 ч. В присутствии ингибитора рибонуклеазы из плаценты человека (гл. 8, разд. 2.7) трансляция идет еще дольше, до 3 ч. Рис. 3 иллюстрирует использование системы зародышей пшеницы для трансляции глобиновой мРНК и РНК из мышиных клеток эритролейкемии Френд.

3.3. Обработка микрококковой нуклеазой

Уровень фонового включения в экстрактах зародышей пшеницы весьма низок; он слегка колеблется, и его можно еще более понизить путем обработки экстрактов микрококковой нуклеазой. Методику обработки нуклеазой лизата ретикулоцитов (разд. 2.4.1) можно использовать без всяких изменений (следует лишь исключить гемин) и для приготовления экстракта зародышей пшеницы. Условия инкубации для обработанного нуклеазой экстракта зародышей пшеницы такие же, как и в случае необработанных экстрактов (разд. 3.2).

3.4. Преимущества и недостатки

Наиболее очевидные достоинства системы зародышей пшеницы — простота приготовления и низкая стоимость. В отличие от системы лизата ретикулоцитов отсутствуют проблемы, связанные с необходимостью содержать животных в специальных условиях, а приготовление большого числа различных экстрактов для сравнения их активности занимает немного времени. Кроме того, экстракты зародышей пшеницы в отличие от необработанного лизата ретикулоцитов чувствительны к стимуляции общего синтеза белка при добавлении экзогенной мРНК без предварительной обработки микрококковой нуклеазой. Если необходимо, и без того низкое фоновое включение можно еще более понизить с помощью обработки микрококковой нуклеазой (разд. 3.3). В оптимальных условиях при наличии высокоактивной мРНК эффективность включения аминокислот может возрасти до 400 раз. Система зародышей пшеницы была также использована в сочетании с системами транскрипции in vitro

для синтеза полипептидных продуктов, кодируемых вирусными и комплементарными ДНК [11].

Недостатки этой системы заключаются в том, что оптимальные ионные условия трансляции очень сильно зависят от природы и концентрации мРНК и может понадобиться подбирать их специально для каждой матрицы. Кроме того, имеются данные [12], что при низких уровнях стимуляции добавление экзогенной РНК приводит и к увеличению эндогенного синтеза белка, поэтому наблюдаемые продукты могут кодироваться не только исследуемой РНК. Но самый большой недостаток состоит в том, что у системы зародышей пшеницы наблюдается тенденция к синтезу неполноразмерных продуктов из-за преждевременной терминации — трансляции и высвобождения пептидил-тРНК. Это может оказаться серьезной проблемой при трансляции длинных мРНК, кодирующих полипептиды с мол. массой, превышающей 60 кДа. Однако эту трудность можно преодолеть, добавив в систему полиамины спермидин и спермин, которые увеличивают скорость элонгации цепи (до уровня, сравнимого с таковым для лизатов ретикулоцитов) и снижают оптимальную концентрацию Mg^{2+}. Поскольку в системе зародышей пшеницы происходит некоторое расщепление длинных мРНК под действием эндонуклеаз, при добавлении полиаминов повышается вероятность того, что синтез полноразмерных продуктов успеет осуществиться до деградации матрицы.

4. Другие эукариотические бесклеточные системы

Помимо широко используемых систем лизата ретикулоцитов и зародышей пшеницы для трансляции экзогенных мРНК или для исследования регуляции синтеза белка применялось множество экстрактов разных эукариотических клеток. Как правило, эти системы представляют собой супернатанты, полученные путем центрифугирования клеточных суспензий при 10 000—30 000 *g*, предынкубированные или обработанные нуклеазой для удаления эндогенной мРНК и затем диализованные или пропущенные через сефадекс G-25 для стандартизации ионных условий. Такие супернатанты обычно получают из суспензионных клеточных культур, выращенных в большом объеме, или из асцитных опухолей мышей. В последнем случае легко получить большое количество материала, но с этим объектом непросто работать, если изучается влияние изменения клеточной физиологии на трансляцию.

В качестве источника бесклеточной системы широко использовались клетки мышиной асцитной опухоли Кребс-II. Эта система транслирует экзогенные клеточные и вирусные мРНК [13]. Экстракты со сходными свойствами можно получить из

мышиных L-клеток, клеток асцитной опухоли Эрлиха, HeLa, клеток яичника китайского хомячка (CHO); все эти клетки можно культивировать в большом объеме (много литров). Описанная в настоящей главе методика с успехом применялась для клеток асцитной опухоли Эрлиха [14, 15] и, по-видимому, может использоваться в случае других типов клеток, перечисленных выше.

4.1. Получение экстрактов клеток асцитной опухоли Эрлиха

Методика приготовления экстрактов описана в табл. 11. Сразу после получения экстракт можно заморозить аликвотами по 200 мкл в жидком азоте, или провести предварительную инкубацию (разд. 4.2), или обработать микрококковой нуклеазой (разд. 4.4), чтобы понизить фон эндогенного синтеза белка. Цитоплазматические экстракты, приготовленные этим методом из клеток Эрлиха, содержат 60—100 A_{260} ед. в 1 мл, а выход составляет 4 мл из 10^9 клеток.

Таблица 11. Приготовление экстракта клеток асцитной опухоли Эрлиха

Все процедуры следует проводить при 4 °C.

1. Соберите клетки, выращенные до плотности $\sim 10^6$ клеток/мл, центрифугированием в течение 5 мин при 1000*g* при 4 °C[1].
2. Слейте супернатант, ресуспендируйте клетки в 250 мл 0,15 М NaCl, 20 мМ HEPES (доведите pH до 7,2 раствором KOH) и отцентрифугируйте, как указано в п. 1.
3. Повторите этап 2.
4. Измерьте объем осажденной клеточной массы, отцентрифугировав ее в градуированной конической центрифужной пробирке.
5. Дайте клеткам набухнуть, суспендировав их в двух объемах 10 мМ KCl, 1,5 мМ ацетата магния, 7 мМ 2-меркаптоэтанола, 10 мМ HEPES (доведите pH до 7,5 раствором KOH) (гипотонический буфер). Оставьте суспензию на 10 мин во льду.
6. Гомогенизируйте суспензию 20 движениями пестика в гомогенизаторе Даунса с минимальным зазором или лизируйте клетки, добавив нонидет P-40 до концентрации 0,25%.
7. Добавьте следующий раствор в объеме, составляющем 0,4 объема клеточной массы:
   0,55 М KCl
   2,5 мМ спермидин
   3,5 мМ 2-меркаптоэтанол
   50%-ный глицерол
   0,1 М HEPES (доведите pH до 7,5 раствором KOH)
8. Отцентрифугируйте смесь 10 мин при 20 000*g* при 4 °C.
9. Соберите постмитохондриальный супернатант, стараясь не захватывать жировую пленку. Этот супернатант можно хранить, предынкубировать или обрабатывать микрококковой нуклеазой (см. разд. 4.1).

[1] Если необходимо сохранить эндогенные полисомы, клетки следует прежде всего быстро охладить. Для этого культуру смешивают с равным объемом измельченного льда в центрифужных стаканах.

При желании экстракты клеток можно диализовать (четыре смены буфера в течение 4 ч) или пропустить через сефадекс G-25 (грубый) (не менее 5 мл смолы на 1 мл экстракта) при 4 °С, чтобы понизить концентрации аминокислот и стандартизовать концентрации ионов перед хранением. В обоих случаях лизат уравновешивают буфером, содержащим 90 мМ KCl, 2 мМ ацетат магния, 7 мМ 2-меркаптоэтанол, 10 мМ HEPES (оттитрованный KOH до pH 7,6). После пропускания через сефадекс обычно происходит разбавление экстракта в 2—3 раза.

4.2. Предынкубация клеточных экстрактов

Когда клеточные экстракты инкубируют при 37 °С в условиях, оптимальных для белкового синтеза (разд. 4.3), происходит трансляция эндогенной мРНК. Обычно это приводит к завершению синтеза предсуществовавших полипептидных цепей при низком уровне реинициации (см. разд. 7.2). Вследствие этого полисомы распадаются и накапливаются одиночные рибосомы; этот процесс часто называют «соскальзыванием» рибосом (run-off). Эндогенная мРНК либо расщепляется нуклеазами, либо остается в виде нетранслируемых РНП-комплексов в зависимости от происхождения бесклеточной системы. В любом случае фоновый уровень белкового синтеза падает практически до нуля, что позволяет изучать трансляцию только экзогенных мРНК.

Предынкубацию клеточных экстрактов проводят следующим образом. К 1 объему свежеприготовленного экстракта добавляют 0,1 объема раствора, содержащего 10 мМ ATP, 2 мМ GTP, 0,1 М креатинфосфат и 1,6 мг/мл креатинфосфокиназы, и инкубируют 45 мин при 37 °С. Центрифугируют 5 мин при 16 000 *g* при 4 °С, диализуют супернатант или пропускают его через сефадекс G-25, как описано выше (разд. 4.1), и замораживают небольшими аликвотами. Приготовленные таким образом предынкубированные системы остаются стабильными в жидком азоте до 2 лет, но размораживать их для использования можно только один раз.

4.3. Условия инкубации для синтеза белка

В табл. 12 приведены конечные концентрации солей, аминокислот и соединений — источников энергии, необходимых для оптимальной трансляции как эндогенных, так и добавленных мРНК в экстрактах клеток Эрлиха и других аналогичных системах. Реакцию обычно проводят в объеме 25—100 мкл, в котором на долю экстракта приходится 50—60%. Необходимые добавки удобнее всего вносить в виде 10-кратного исходного раствора, составляющего 0,1 конечного объема реакционной

Таблица 12. Конечные концентрации компонентов, необходимых для синтеза белка в экстрактах культур клеток млекопитающих

75—110 мМ KCl (или до 0,15 М ацетат калия)[1]
1,5—2,5 мМ ацетат магния[1]
50 мкМ аминокислоты без метионина (или без другой аминокислоты в зависимости от того, какая меченая аминокислота используется)
До 500 мкКи/мл [^{35}S]-метионина (или другой радиоактивной аминокислоты).
1 мМ ATP
5 мМ креатинфосфат
0,25 мМ GTP
0,18 мг/мл креатинфосфокиназы
0,5 мМ ДТТ (или 6 мМ 2-меркаптоэтанол)
0,4 мМ спермидин
30 мМ HEPES (довести pH до 7,5 раствором KOH)
До 40 мкг/мл мРНК

[1] Оптимальные концентрации ионов K^+ и Mg^{2+} зависят от природы транслируемой мРНК.

смеси, в котором концентрации компонентов подобраны с учетом их количества в клеточном экстракте. Исходный раствор можно хранить при —20 °С в течение нескольких недель. Инкубацию проводят при 30 или 37 °С. Кинетика включения аминокислот зависит не только от температуры, но и от концентрации экстракта и от того, трансляция какой мРНК — эндогенной или экзогенной — регистрируется. При трансляции эндогенной мРНК включение аминокислот обусловлено в значительной степени завершением синтеза предсуществовавших полипептидов, а не инициацией in vitro.

Оптимальные концентрации Mg^{2+} и K^+ особенно сильно зависят от природы транслируемой мРНК и колеблются в пределах, указанных в табл. 12. Для некоторых крупных РНК, соответствующих, например, геномам вирусов полиомиелита или энцефаломиокардита, оптимальные концентрации необычно высокие. По этим причинам, а также потому, что точные концентрации компонентов, необходимые для достижения максимального синтеза белка, могут зависеть от предшествующей обработки клеточных экстрактов (был ли он предынкубирован, диализован, подвергнут гель-фильтрации и т. п.), оптимальные концентрации лучше всего подобрать для каждого нового препарата экстракта и каждой мРНК, которую предстоит исследовать. Добавление спермидина до конечной концентрации 0,4 мМ стимулирует трансляцию и снижает оптимальную концентрацию ионов магния, особенно в системах, которые были отдиализованы или пропущены через сефадекс; поэтому следует также подобрать оптимальную концентрацию этого компонента. Как и в бесклеточных системах ретикулоцитов (табл. 4) или зародышей пшеницы (табл. 9), замена хлорида калия на

ацетат калия позволяет использовать при синтезе белка более высокую концентрацию ионов K^+, так как высокая концентрация хлорид-ионов подавляет инициацию. Это особенно ценно, когда используются мРНК, у которых максимальная скорость инициации достигается лишь при высокой концентрации ионов K^+. (Правда, вряд ли концентрацию ионов ацетата, доходящую до 0,15 М, можно назвать физиологической.)

В эукариотических бесклеточных системах используют одну из двух систем генерирования энергии. Система, включающая пируваткиназу и фосфоенолпируват, имеет то преимущество, что она может непосредственно превращать ADP в ATP и GDP в GTP, тогда как системе, включающей креатинфосфокиназу и креатинфосфат, для регенерации GTP необходимы нуклеозиддифосфаткиназа (которая уже имеется в клеточном экстракте) и ATP. Сообщалось, что некоторые препараты креатинфосфокиназы загрязнены рибонуклеазой, а креатинфосфат — пирофосфатом (ингибитором аминоацилирования тРНК). Тем не менее в большинстве случаев это сочетание хорошо работает в качестве системы генерирования энергии. Для синтеза ATP при добавлении фруктозо-1,6-бисфосфата можно использовать и эндогенные ферменты гликолиза при условии, что in vitro этот путь достаточно эффективен и способен поддерживать нужный уровень ATP.

Следует сказать несколько слов о других компонентах. В качестве буфера лучше использовать HEPES, чем трис, так как у него ниже значение pK и оно мало изменяется при изменении температуры в интервале от 0 до 37 °С. Для достижения максимальной активности экстрактов, которые были подвергнуты диализу или фракционированию на сефадексе, необходимо добавить ДТТ или 2-меркаптоэтанол; эти соединения, если они присутствуют во всех буферных растворах, защищают эндогенный ингибитор рибонуклеазы от инактивации. Сравнительно низкая рибонуклеазная активность во многих эукариотических бесклеточных системах, по-видимому, объясняется именно тем, что в них присутствует избыток этого эндогенного ингибитора. Концентрации аминокислот в экстрактах культивируемых клеток, как правило, достаточно поддерживать на уровне около 40 мкМ (кроме радиоактивной аминокислоты, концентрация которой ниже). Поскольку эффективность этих систем гораздо ниже, чем у лизата ретикулоцитов (разд. 2.3), можно не опасаться, что за время бесклеточного синтеза белка исчерпаются запасы какой-либо аминокислоты.

Включение аминокислот регистрируется точно так же, как в случае лизата ретикулоцитов (табл. 6; разд. 2.3), только не проводят обесцвечивания перекисью водорода. Обычно для определения радиоактивности отбирают пробы объемом 10—20 мкл,

4.4. Обработка микрококковой нуклеазой

Обработанные нуклеазой бесклеточные экстракты можно приготовить по методике, описанной для лизата ретикулоцитов (разд. 2.4), за исключением того, что не нужно добавлять гемин. Как и в случае лизата ретикулоцитов, эндогенная мРНК при этом деградирует, в результате чего бесклеточный экстракт становится зависимым от экзогенной мРНК и фоновое включение аминокислот уменьшается. Некоторые авторы [15] после нуклеазной обработки и добавления ЭГТА фракционируют экстракты с помощью гель-фильтрации для удаления эндогенных аминокислот, однако это совершенно не обязательно. Условия инкубации при использовании обработанных нуклеазой экстрактов такие же, как и для необработанных (разд. 4.3).

4.5. Другие бесклеточные системы

В разд. 4.1—4.4 было описано приготовление и использование бесклеточных систем из клеток асцитной опухоли Эрлиха и других подобных клеток, например HeLa или мышиных L-клеток. Кроме того, активные экстракты были выделены из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [16]. Оказалось также, что из очищенных или частично очищенных компонентов можно создавать фракционированные системы, в которых осуществляется синтез полноразмерных полипептидных продуктов [17, 18]. Для этого необходимо выделить рибосомные субчастицы, факторы инициации, элонгации и терминации, тРНК и аминоацил-тРНК—синтетазы, а также мРНК. Эта работа весьма трудоемка, но подобные исследования дали важную информацию о роли различных компонентов механизма белкового синтеза. Если читателя интересуют подробности тех методов, которые применяются в этой более узкой области исследований, ему следует обратиться к оригинальным работам [17, 18].

4.6. Достоинства и недостатки бесклеточных систем культивируемых клеток

Из клеток млекопитающих, растущих в культуре, или из клеток асцитных опухолей не составляет труда получить нефракционированные постмитохондриальные экстракты. Если речь идет об асцитных клетках, необходимо позаботиться о пересеве клеток и о содержании животных — их хозяев. Культивируемые клетки необходимо нарастить в достаточно большом количестве. Это не составляет особого труда в случае быстро делящихся клеток в суспензионной культуре, например клеток асцитной опухоли Эрлиха или HeLa; достаточное количество

клеточных экстрактов можно получить из 1—5 л культуры. С клетками, растущими в монослое, возникает больше проблем, однако небольшое количество активного экстракта легко приготовить и в этом случае. В целом это несколько проще, чем получить препарат лизата ретикулоцитов, и сложнее, чем приготовить систему из зародышей пшеницы.

Основной недостаток бесклеточных систем клеток млекопитающих неэритроидной природы — сравнительно низкая белоксинтезирующая активность. В экстрактах из некоторых типов клеток наблюдается лишь слабая инициация синтеза полипептидов на любых экзогенных мРНК, хотя большинство экстрактов способно осуществлять элонгацию предсуществовавших незавершенных полипептидных цепей. В тех системах, где инициация идет сравнительно активно (клетки асцитной опухоли Эрлиха, мышиные L-клетки и HeLa), скорость элонгации цепи часто оказывается низкой по сравнению со скоростью in vivo, а при трансляции длинных мРНК возможна преждевременная терминация в некоторых участках. Тем не менее трансляция обычно идет правильно, и инициация происходит только в местах истинных стартовых кодонов. Даже в случае трансляции таких длинных матриц, как РНК вирусов полиомиелита или ЭМК, образуется некоторое количество полноразмерных продуктов (до 250 000 кДа), особенно при высокой концентрации ионов K^+ (концентрация 0,155 М оптимальна для элонгации, хотя и несколько велика для максимальной инициации). Кроме того, в клеточных экстрактах часто происходит правильное расщепление больших вирусных полибелков с образованием аутентичных продуктов меньшего размера [19]. Бесклеточные системы из клеток млекопитающих использовались также для правильной трансляции продуктов вирусной транскрипции, образованных in situ сердцевинной частью вирионов, добавленной в реакционную смесь. В этом отношении подобные системы обладают тем уникальным свойством, что их можно использовать для изучения изменений трансляционной и посттрансляционной активности, возникающих при различных воздействиях на клетки, из которых они получены, например при вирусной инфекции или голодании (разд. 7.2).

Причины пониженной эффективности инициации и элонгации в системах из любых клеток млекопитающих, кроме ретикулоцитов, неясны. Возможно, отчасти это связано с тем, что значительная часть рибосом (видимо, вместе со связанными факторами и тРНК) теряется во время получения экстрактов. В некоторых случаях фактор инициации транскрипции eIF-2 инактивируется в результате фосфорилирования эндогенными протеинкиназами. Добавление гемина во время приготовления [20] или при инкубации [21] экстрактов может предотвратить

инактивацию фактора и таким образом стимулировать инициацию. Однако гемин не всегда эффективен, и часто, несмотря на образование комплекса инициации между рибосомной 40S-субчастицей и формилметиониновой тРНК (для этого необходим активный фактор eIF-2), система все-таки оказывается не в состоянии осуществить полный цикл инициации синтеза полипептидов. Вполне возможно также, что «камнем преткновения» служит связывание мРНК с рибосомами. По-видимому, как эндогенная, так и экзогенная мРНК сохраняются в экстракте в нетранслируемой форме (в виде РНП-комплексов), а не деградируют в сколько-нибудь заметной степени. В самом деле, при предынкубации многих клеточных экстрактов мРНК сравнительно мало деградирует, так как трансляцию можно реактивировать с помощью гель-фильтрации системы [15]. По всей вероятности, во время инкубации бесклеточных систем из клеток млекопитающих происходит накопление небольших молекул, обладающих ингибирующим действием, например GDP, и в результате инициация сразу же блокируется. Так, быстрое исчезновение ATP и GTP даже при наличии системы генерирования энергии наблюдалось в бесклеточной системе из печени (S. Morley, University of Cambridge, личное сообщение). Очевидно, очень важно поддерживать необходимую концентрацию ATP и GTP и предупреждать накопление продуктов их расщепления.

5. Анализ продуктов трансляции

Успешное получение активного бесклеточного лизата и мРНК, которая в нем транслируется, — лишь первый этап всестороннего изучения мРНК. Почти во всех случаях необходимо исследовать природу синтезируемых полипептидных продуктов — или для того, чтобы установить, что мРНК, продукт которой уже известен, транслируется правильно, или чтобы выяснить, какие белки кодирует данная мРНК. Определив количество специфических продуктов, можно попытаться оценить содержание различных видов мРНК в смеси или в разных препаратах. Существует много способов изучения продуктов трансляции; большинство из них основано на включении в белки радиоактивных аминокислот во время синтеза. Ниже вкратце рассмотрены наиболее распространенные методы изучения продуктов трансляции.

5.1. Стимуляция включения аминокислот

Как описано в разд. 2—4, существует несколько типов мРНК-зависимых систем трансляции, т. е. систем, в которых в отсутствие экзогенной мРНК наблюдается очень слабое включение

аминокислот или его не наблюдается вообще. Если при этом добавляется чистая мРНК только одного вида, то уровень включения аминокислот в таких системах должен непосредственно отражать количество синтезированного продукта. Однако всецело полагаться на эти данные не следует, поскольку важно убедиться, что мРНК транслируется правильно и полностью. Далее, не исключено, что добавление экзогенной мРНК стимулирует трансляцию остаточной эндогенной мРНК (например, защищая ее от нуклеаз). Наконец, если транслируется смесь мРНК, включение аминокислот лишь указывает, что происходит синтез каких-то белков, ничего не говоря об их природе. По всем этим причинам в тех случаях, когда необходима информация о природе синтезируемого продукта, следует использовать те или иные методы из числа перечисленных ниже.

5.2. Электрофорез в ПААГ — ДСН

Для анализа продуктов трансляции в бесклеточных системах наиболее широко применяется универсальный метод электрофореза в пластинках ПААГ в денатурирующих условиях в присутствии ДСН. В сочетании с радиоавтографией или флюорографией высушенных гелей этот метод позволяет разделять в одной пробе большое число радиоактивных белков с различной молекулярной массой. Поэтому он прекрасно подходит для изучения продуктов синтеза в бесклеточной системе, функционирование которой зависит от нескольких мРНК. Еще больше возможностей дает анализ с помощью двумерного разделения в ПААГ: изоэлектрического фокусирования в первом направлении и электрофореза в ПААГ—ДСН во втором; такой анализ выявляет еще больше полипептидных продуктов. Методики электрофореза были недавно описаны в одном из томов настоящей серии [22], поэтому здесь мы ограничимся обсуждением вопросов подготовки образца для нанесения на гель.

Очень важно, чтобы полипептидные продукты обладали достаточно высокой удельной радиоактивностью, тогда для их выявления не понадобится слишком продолжительная экспозиция рентгеновской пленки. Если использовать в реакции [^{35}S]-метионин в концентрации до 500 мкКи/мл, можно получить высокомеченый белок при сравнительно небольших расходах, хотя следует иметь в виду, что есть полипептиды, в которых эта аминокислота встречается редко или вообще отсутствует. Для электрофореза в ПААГ—ДСН всю реакционную смесь следует развести буфером для нанесения, содержащим ДСН, 2-меркаптоэтанол, глицерол, трис-HCl и бромфеноловый синий, чтобы получить следующие конечные концентрации:

2%-ный ДСН

20%-ный глицерол
70 мМ 2-меркаптоэтанол
0,001%-ный бромфеноловый синий
60 мМ трис-HCl (pH 6,8)

Образцы нужно прокипятить в течение 3 мин перед нанесением на гель или хранить при —20 °С, пока они не понадобятся. Пластинчатые гели нельзя перегружать по общему количеству нанесенного белка, так как при этом ухудшается разрешение. Это особенно важно в отношении лизатов ретикулоцитов, содержащих огромное количество гемоглобина. Обычно на одну дорожку пластинчатого геля толщиной 0,15 см можно нанести не более 5 мкл трансляционной смеси (разведенной в 5—10 раз буфером для нанесения). На параллельную дорожку следует нанести маркеры молекулярной массы, чтобы откалибровать гель. Если есть радиоактивные маркеры, их следует смешать с немеченым клеточным экстрактом, чтобы маркеры и продукты трансляции находились в геле в одинаковых условиях. Важно нанести также контрольный образец, не содержащий мРНК, чтобы проверить, нет ли в смеси меченых белков, которые не кодируются экзогенной матрицей. В лизате ретикулоцитов, обработанном нуклеазой, [^{35}S]-метионин часто включается в какой-то полипептид с мол. массой 42 кДа в реакции, которая вообще не связана с синтезом белка! Если необходимо, небольшие меченые новообразованные пептиды, еще присоединенные к тРНК, можно удалить, обработав пробы панкреатической рибонуклеазой в концентрации 100 мкг/мл в течение 10 мин при 30 °С перед добавлением буфера для нанесения.

Следует также остановиться на интерпретации данных по радиоавтографии меченых продуктов бесклеточной трансляции. Как видно из рис. 4, гомогенная мРНК одного вида транслируется иногда с образованием широкого спектра продуктов в зависимости от того, какая система используется. Это наблюдается в первую очередь при трансляции больших вирусных РНК и может быть связано как с преждевременной терминацией синтеза в определенных участках мРНК, так и с посттрансляционным расщеплением больших полипептидных продуктов (разд. 6.2).

5.3. Иммунопреципитация продуктов трансляции

Надежную идентификацию и количественное определение продуктов бесклеточного синтеза может обеспечить иммунологический анализ, если только имеются соответствующие антитела. Это особенно важно при изучении трансляции смеси большого числа разных мРНК, дающих множество полипептидов. В литературе можно найти многочисленные примеры использо-

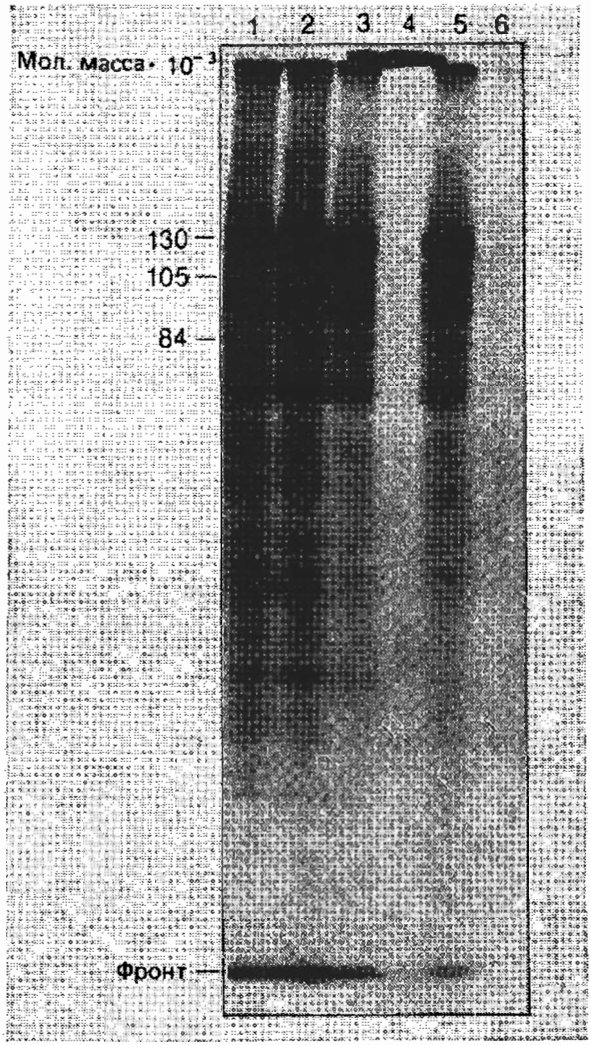


Рис. 4. Радиоавтография продуктов трансляции после электрофореза в ПААГ — ДСН. РНК вируса ЭМК (40 мкг/мл) транслировали в предынкубированном и диализованном экстракте из культуры мышиных L-клеток (разд. 4) в присутствии [^{35}S]-метионина (100 мкКи/мл) в течение 150 мин при 30 °С. Аликвоты по 35 мкл после соответствующей обработки наносили для анализа мечепых продуктов на 7,5%-ный ПААГ с ДСН, затем гель сушили и проводили радиоавтографию. Относительные молекулярные массы основных ВЭМК-специфических полипептидов указаны слева. Обратите внимание, что при трансляции очищенной индивидуальной мРНК образуется много полипептидов. Дорожка 1 — контрольная инкубация; 2 — то же, с до-

вания иммунопреципитации для анализа продуктов бесклеточной трансляции. Выбор оптимального подхода зависит от свойств имеющихся антител и исследуемого антигена. Прежде всего необходимо принять все меры для предотвращения загрязнения системы в результате неспецифической преципитации посторонних меченых белков или адсорбции белков на стенках пробирок во время промывки нерастворимых комплексов антигенов с антителами. Чтобы проверить, не загрязнен ли конечный продукт, нужно провести электрофорез в ПААГ—ДСН с последующей радиоавтографией или флюорографией.

Применимая для большинства случаев методика иммунопреципитации описана в табл. 13. Введение неионного или ионного детергента во время иммунопреципитации и последующих промывок помогает снизить неспецифическое загрязнение комплексов антиген — антитело — белок А — сефароза, но следует отметить, что некоторые комплексы антиген — антитело диссоциируют в присутствии детергентов. Именно по этой причине, в частности, важно проводить предварительные эксперименты, чтобы подобрать условия для получения максимального выхода иммунопреципитата при минимальном приемлемом уровне загрязнения. При последней промывке следует исключить детергент, поскольку его присутствие может привести к искажению результатов электрофоретического разделения продуктов трансляции в ПААГ—ДСН.

5.4. Анализ триптических пептидов

Еще один весьма специфический способ проверки правильности трансляции состоит в исследовании набора радиоактивных пептидов, которые получаются при гидролизе белка трипсином. Этот подход можно использовать применительно ко всей реакционной смеси, если матрицей служит очищенная индивидуальная мРНК; в противном случае его можно применять для исследования иммунопреципитированного материала или отдельных полос в геле, если их радиоактивность достаточно вы-

бавлением пострибосомного супернатанта L-клеток, обработанных интерфероном; 3 — то же, с добавлением двухцепочечной РНК (1 мкг/мл); 4 — то же, с добавлением экстракта обработанных интерфероном клеток и двухцепочечной РНК (1 мкг/мл); 5 — то же, но РНК вируса ЭМК добавлена через 30 мин после начала инкубации; 6 — условия как для дорожки 4, но РНК вируса ЭМК добавлена после 30 мин инкубации. Обратите внимание на способность системы транслировать РНК, добавленную даже через 30 мин после начала инкубации, и подавление трансляции на 80—90% в образцах, проанализированных на дорожках 4 и 6. Ингибирование обусловлено индукцией 2′,5′-олигоаденилатсинтетазы и протеинкиназы под действием интерферона. Оба фермента активируются двухцепочечной РНК и подавляют синтез белка (разд. 7).

Таблица 13. Иммунопреципитация продуктов трансляции[1]

1. По окончании инкубации бесклеточной системы трансляции разведите реакционную смесь в 5—10 раз буфером для иммунопреципитации:
   0,1 М NaCl
   1 мМ ЭДТА
   1%-ный нонидет Р-40
   10 мМ трис-HCl (pH 7,5)
2. Добавьте нужный объем антисыворотки (его следует определить в предварительных экспериментах) и оставьте смесь на 3 ч при комнатной температуре, чтобы образовался комплекс антиген — антитело.
3. Проведите одну из следующих процедур.
   а. Добавьте антиген-носитель и избыток антител, чтобы образовался иммунопреципитат комплексов меченого антигена с антителами.
   б. Добавьте сефарозу с ковалентно пришитым белком А, чтобы адсорбировать комплексы.

   Необходимые количества этих компонентов зависят от используемой антисыворотки, и их следует определить экспериментально.
4. Проинкубируйте смесь, встряхивая ее в течение 40 мин в маленькой пластиковой пробирке с круглым дном при 20 °С.
5. Перенесите материал в коническую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл. Отцентрифугируйте 1 мин при 14 000*g*.
6. Отберите и отбросьте супернатант. Трижды промойте осадок, ресуспендируя его в 1 мл буфера для иммунопреципитации с последующим центрифугированием.
7. Ресуспендируйте осадок в 0,1 мл буфера для иммунопреципитации без детергента и перенесите его в другую микроцентрифужную пробирку объемом 0,4 мл[2]. Отцентрифугируйте, как указано в п. 5.
8. Отберите и отбросьте супернатант. Ресуспендируйте осадок в 20 мкл буфера с ДСН для нанесения на ПААГ (разд. 5.2) и прогрейте 3 мин при 90 °С.
9. Удалите сефарозу с пришитым белком А с помощью центрифугирования (если она использовалась на стадии б) и проанализируйте растворенный антиген с помощью электрофореза в ПААГ—ДСН (разд. 5.2).

[1] Лучше всего проводить всю эту процедуру сразу после трансляции, так как замораживание меченых продуктов трансляции до иммунопреципитации может привести к неспецифическому осаждению денатурированных белков. Если все-таки образец придется заморозить, то перед добавлением антисыворотки следует удалить весь нерастворимый материал с помощью центрифугирования.

[2] Перенос в новые пробирки позволяет свести к минимуму загрязнение белком, сорбированным на стенках предыдущей пробирки.

сока. Особенно ценно, если триптические пептиды, помеченные in vitro одним изотопом, можно сравнить с пептидами того же белка, помеченного другим изотопом.

В табл. 14 описана методика расщепления трипсином меченых продуктов сразу после проведения трансляции. Если нужно проанализировать спектр триптических пептидов после их разделения с помощью электрофореза, кусочки геля, содержащие нужные полосы, инкубируют в 10 мМ фосфате натрия (pH 7,2), содержащем 0,1%-ный ДСН, в течение 24 ч при 37 °С, чтобы элюировать белки. Можно также обработать высушенные фрагменты геля 6,0 М мочевиной, 0,5%-ным ДСН. Раство-

Таблица 14. Триптическое расщепление продуктов трансляции

1. Добавьте панкреатическую рибонуклеазу до концентрации 25 мкг/мл и ЭДТА до конечной концентрации 50 мМ. Проинкубируйте 15 мин при 37 °С (чтобы гидролизовать тРНК в составе пептидил-тРНК).
2. Осадите белки добавлением ТХУ до конечной концентрации 5%. Проинкубируйте 30 мин во льду.
3. Осадите осадок центрифугированием (2000*g*, 5 мин) и промойте его 5%-ным ТХУ, затем смесью этанола с эфиром (2 : 3, по объему) и, наконец, эфиром.
4. Проведите окисление белка с помощью надмуравьиной кислоты или проведите реакцию аминоэтилирования.

   Окисление надмуравьиной кислотой

   Вначале смешайте 950 мкл муравьиной кислоты с 50 мкл 30%-ной перекиси водорода и проинкубируйте 2 ч при комнатной температуре. Тем временем высушите белок и растворите его в смеси муравьиной кислоты с метанолом (5 : 1, по объему) в концентрации 1 мг белка в 60 мкл смеси. После этого добавьте 100 мкл смеси муравьиной кислоты с перекисью водорода на 1 мг белка. Проинкубируйте 2,5 ч при 0 °С. Добавьте 2 мл воды на 1 мг белка и лиофилизуйте в течение ночи.

   Аминоэтилирование

   Растворите осадок в 8 М деионизованной мочевине[1], 5 мМ ЭДТА, 0,19 М 2-меркаптоэтаноле, 0,5 М трис-HCl (pH 8,6) в концентрации ~15 мг белка в 1 мл. Перед добавлением в пробирку с белком через этот раствор следует в течение 5 мин пропускать аргон. Проинкубируйте раствор белка 2 ч при комнатной температуре. Затем добавьте 25 мкл этиленимина на 1 мл и проинкубируйте еще 2 ч. Осадите и промойте белок, как указано в пп. 2 и 3, и лиофилизуйте осадок белка.
5. Растворите осадок после проведения реакции 4 в 0,1 М бикарбонате аммония, pH 8,9, добавьте трипсин (соотношение фермент: субстрат равно 1 : 100 по весу) и проинкубируйте 5 ч при 37 °С. Через 2 ч инкубации добавьте еще столько же трипсина.
6. Лиофилизуйте образец и растворите его в минимальном объеме воды для дальнейшего анализа триптических пептидов (разд. 5.4).

[1] Деионизуйте мочевину, пропустив раствор через колонку со смешанной смолой Bio-Rad AG 501-X8. Можно использовать ультрачистую мочевину (ultra-pure), которая не требует дополнительной очистки.

ренные белки осаждают затем ТХУ в присутствии БСА-носителя (100 мкг/мл) и обрабатывают, как описано в табл. 14.

Триптические пептиды можно проанализировать с помощью двумерного разделения в тонком слое силикагеля на пластинках 20×20 см [23] или на хроматографической бумаге Whatman 3ММ [24], проведя в первом направлении высоковольтный электрофорез [400 В, 3—4 ч, в буфере, состоящем из водного раствора пиридина и уксусной кислоты при pH 6,5 (474 мл воды : 25 мл пиридина : 1 мл уксусной кислоты) или при pH 3,5 (289 мл воды : 1 мл пиридина : 10 мл уксусной кислоты)], а во втором направлении хроматографию в смеси бутанол—уксусная кислота—вода (3 : 1 : 1, по объему). Радиоактивные пятна выявляют с помощью радиоавтографии. Можно также разделить пептиды с помощью ионообменной хроматографии на колонке

0,9×16 см со смолой Aminex-S (фирма Bio-Rad) и определить радиоактивность фракций [25]. Последний метод особенно информативен в сочетании с двойным изотопным мечением. Например, продукт трансляции, меченный in vitro ^{3}H, смешивают с аутентичным белком, меченным ^{35}S; тогда соотношение изотопов в колоночных фракциях покажет, происходит ли совместное разделение триптических пептидов, подтверждая или опровергая тем самым их идентичность.

5.5. Расшифровка аминокислотной последовательности

Специфические продукты трансляции очищенных индивидуальных мРНК можно также охарактеризовать и количественно определить путем расшифровки их N-концевых аминокислотных последовательностей [26]. Правда, это дорогая процедура, требующая большого количества радиоактивных аминокислот и прибора для секвенирования белков с высокой чувствительностью. Сходный метод, особенно ценный для изучения участков инициации в мРНК, — синтез коротких инициаторных пептидов с меченым N-концевым [^{35}S]-метионином. Чтобы ограничить синтез белка несколькими первыми аминокислотами, в бесклеточную систему добавляют какой-нибудь ингибитор элонгации цепи, например спарсомицин, и используют довольно малые времена инкубации [27]. Пептидил-тРНК экстрагируют фенолом в присутствии РНК-носителя и осаждают этанолом. Затем образцы подвергают полному гидролизу рибонуклеазой, лиофилизуют и меченые пептиды разделяют с помощью высоковольтного электрофореза на бумаге при pH 3,5 [28]. Пятна выявляют радиоавтографией и идентифицируют, сравнивая их по подвижности со стандартными метионил-пептидами.

5.6. Анализ биологической активности

Наконец, продукты трансляции можно идентифицировать по их биологической активности. Правда, это удается лишь в редких случаях, так как в бесклеточных системах синтезируется ничтожное количество белков. Тем не менее, если фермент или какой-либо другой белок имеет достаточно высокую специфическую биологическую активность, его синтез можно количественно оценить путем прямого определения этой активности. Для успешного применения этого подхода нужно, чтобы все посттрансляционные модификации, необходимые для функционирования белка, осуществлялись in vitro (разд. 6). В качестве примеров, когда этот подход оказался полезным, можно привести трансляцию в лизате ретикулоцитов мРНК, кодирующих β-интерферон [29] и тимидинкиназу вируса осповакцины [30].

6. Процессинг продуктов трансляции

С помощью бесклеточных систем синтеза белка можно не только идентифицировать первичные продукты трансляции. В соответствующих условиях в таких системах происходит ряд посттрансляционных модификаций первичных продуктов, в том числе протеолитическое расщепление, гликозилирование, ацетилирование и фосфорилирование специфических участков. В настоящем разделе описаны некоторые методы изучения всех этих реакций.

6.1. Сигнальные последовательности

В работах по бесклеточной трансляции [31, 32] были получены многочисленные данные о существовании N-концевых последовательностей, играющих роль сигналов, обусловливающих внедрение или перенос определенных белков через мембраны эндоплазматического ретикулума. Такой перенос характерен для биосинтеза многих секретируемых и мембранных белков. Процесс начинается на самых ранних этапах синтеза полипептида, когда растущая полимерная цепь «выходит» из рибосомы. Не вызывает сомнения, что внедрение новообразованных полипептидов в мембраны играет большую роль в связывании полисом с мембранами шероховатого ретикулума. Длина сигнальных последовательностей составляет обычно 20—30 аминокислот, они содержат гидрофобные участки и в большинстве случаев отщепляются под действием фермента, локализованного в мембране, до завершения синтеза полипептидной цепи.

Чтобы исследовать эти процессы in vitro, необходимо приготовить не только мРНК, кодирующие соответствующие белки, и системы для их трансляции, но также мембраны, узнающие сигнальные последовательности. Следует также обратить внимание на выбор подходящих условий инкубации и разработку методов идентификации сигнальных последовательностей и обнаружения переноса новообразованных цепей внутрь мембранных везикул.

6.1.1. Выделение микросомных мембран

В табл. 15 описан метод выделения микросомных мембран из поджелудочной железы собаки (ранее ткань этой железы чаще использовали при исследовании процессинга новообразованных секретируемых белков in vitro). В результате получаются препараты, свободные от нуклеазной активности и обладающие высокой процессирующей активностью. Измельченную ткань поджелудочной железы гомогенизируют и получают с помощью дифференциального центрифугирования в сахарозе фрак-

Таблица 15. Получение микросомных мембран, свободных от полисом, из поджелудочной железы собаки [35]

Получение мембран микросом с присоединенными к ним полисомами

1. Извлеките поджелудочную железу собаки хирургическим путем и поместите ее в холодный буфер ТКМ (50 мМ триэтаноламин, pH 7,5, 50 мМ KCl, 5 мМ $MgCl_2$), содержащий 0,25 М сахарозу.
2. Удалите соединительную и жировую ткани, а также крупные кровеносные сосуды. Нарежьте поджелудочную железу на кусочки и пропустите их через пресс из нержавеющей стали (диаметр отверстия 1 мм).
3. Добавьте два объема буфера ТКМ, содержащего 0,25 М сахарозу, и гомогенизируйте ткань в гомогенизаторе с тефлоновым пестиком с мотором (5—10 движений пестика при 400 об/мин).
4. Отцентрифугируйте 10 мин при 13 000g при 4 °С.
5. Соберите супернатант и наслоите его на ступенчатый сахарозный градиент (1,5, 1,75 и 2,2 М сахарозы, по 5 мл каждого раствора) в ТКМ-буфере.
6. Отцентрифугируйте 24 ч при 140 000g при 4 °С.
7. Отберите слой 1,75 М сахарозы (микросомы с присоединенными к ним полисомами). Разведите препарат равным объемом буфера ТКМ и наслоите на 2 мл 1,3 М сахарозы в том же буфере.
8. Отцентрифугируйте 30 мин при 100 000g при 4 °С.
9. Слейте супернатант. Осадок (препарат микросом с полисомами) можно хранить при —70 °С[1].

Получение микросом, свободных от полисом

10. Ресуспендируйте осадок микросом с присоединенными к ним полисомами в ТК-буфере (50 мМ триэтаноламин-HCl, pH 7, 5, 50 мМ KCl) в концентрации 100 ед. A_{260} в 1 мл. Добавьте 0,2 М ЭДТА (pH 7,0) из расчета 3 мкмоль ЭДТА на 10 ед. A_{260} микросом с полисомами.
11. Наслоите аликвоты по 0,5 мл на градиенты 10—55% сахарозы объемом 12,5 мл в буфере ТКМ и отцентрифугируйте 2 ч при 190 000g при 4 °С.
12. Соберите содержимое мутной полосы, расположенной в области 40—45% сахарозного градиента (микросомы, свободные от полисом) и разведите препарат двумя объемами ТК-буфера.
13. Отцентрифугируйте 30 мин при 100 000g при 4 °С.
14. Слейте супернатант и храните осадок при —70 °С.
15. Перед использованием ресуспендируйте осадок с помощью непродолжительной обработки ультразвуком в следующем буфере:
    0,25 М сахароза
    0,1 М KCl
    3 мМ $MgCl_2$
    2 мМ ДТТ
    20 мМ HEPES (доведите pH до 7,3 раствором KOH)

[1] Для дальнейшей очистки этого препарата его можно пропустить через сефарозу CL-2B [33].

цию микросом. Если это необходимо, мембраны освобождают от эндогенных полисом с помощью обработки ЭДТА и повторно пропускают через градиент сахарозы (табл. 15). В работе [33] использовалась также обработка пуромицином в 0,5 М KCl. Подобные препараты микросомных мембран, обладающие способностью узнавать сигнальные последовательности и отщеплять их, можно получить и из печени крысы или из клеток асцитной опухоли [34]. Поскольку какая-либо специфичность в узнавании сигнальных последовательностей микросомными

мембранами отсутствует, оба этих источника, по-видимому, одинаково пригодны. Однако относительная активность препаратов и степень рибонуклеазного загрязнения могут колебаться в зависимости от источника, и их следует проверить, прежде чем использовать эти мембраны для повседневной работы.

6.1.2. Условия инкубации для проведения процессинга

Условия, при которых мРНК транслируются, а их продукты подвергаются процессингу под действием добавленных препаратов микросомных мембран, в основном такие же, как это было описано ранее, в разд. 2—4. В некоторых случаях при анализе протеолитического расщепления под действием мембран в реакционные смеси включают ингибиторы протеаз типа пепстатина, химостатина, антипаина, лейпептина или трасилола [35]. Сами мембраны добавляют в концентрации 5 ед. A_{260} в 1 мл. Часто отмечалось, что высокие концентрации мембран (необходимые для полного завершения процессинга) ингибируют общий синтез белка; этот эффект сильнее выражен в системе из зародышей пшеницы, чем в лизате ретикулоцитов, обработанном микрококковой нуклеазой. Выбор времени инкубации зависит от кинетики синтеза белка и посттрансляционного процессинга. Если вскоре после начала реакции подавить новую инициацию, можно синхронизировать процессинг и выяснить, как он связан во времени с инициацией. Для этого применяют специфические агенты, например m^{7}GMP или эдеин [36]. Точно так же в условиях in vitro можно изучать судьбу предсуществующих новообразованных полипептидных цепей в полисомах, связанных с ретикулумом (если они не были отмыты с помощью ЭДТА). Для этого инициация должна быть полностью блокирована, и тогда происходит только элонгация полипептидов, т. е. система работает в режиме «соскальзывания» («run-off») рибосом [37].

6.1.3. Изучение переноса белков через мембраны и отщепления сигнальных последовательностей

На существование дополнительных N-концевых сигнальных последовательностей указывал тот факт, что первичные продукты трансляции мРНК, кодирующих секреторные белки, несколько длиннее, чем сами эти белки [31, 32]. Присутствие дополнительных 20—30 аминокислот в молекуле белка как раз достаточно, чтобы отличить их от продукта нормальной длины при электрофорезе в ПААГ—ДСН, в частности, для таких небольших белков, как препроинсулин и претрипсиноген. Таким образом, электрофоретическая подвижность является простым

тестом на присутствие сигнальной последовательности [33]. Следует, однако, заметить, что дополнительные модификации первичного продукта трансляции, особенно интенсивное гликозилирование, также могут приводить к изменению электрофоретической подвижности (причем иногда непредсказуемым образом). Поэтому наиболее надежное доказательство наличия N-концевой последовательности или ее отщепления во время трансляции in vitro состоит в прямом определении аминокислотной последовательности радиоактивно меченного белка с помощью автоматической процедуры Эдмана. Присутствие или отсутствие N-концевого метионина не является указанием на отщепление сигнальной последовательности, так как инициирующая аминокислота обычно отщепляется вскоре после начала элонгации полипептидной цепи. Следует также отметить, что во многих системах синтеза in vitro возможно ацетилирование N-концевого остатка новообразованной полипептидной цепи, что затрудняет секвенирование. Для того чтобы подавить реакции ацетилирования, проводят истощение реакционных смесей по эндогенному ацетил-СоА, добавляя 1 мМ оксалоацетат и цитратсинтазу в концентрации 25 ед/мл.

Отщепление сигнальных последовательностей идет обычно сопряженно с трансляцией, одновременно с переносом образующихся полипептидов через микросомные мембраны. Поскольку белки сосредоточиваются при этом внутри микросомных везикул, они оказываются защищенными от протеаз. На этом основан метод регистрации актов переноса белков. В конце трансляции в бесклеточную систему добавляют смесь трипсина и химотрипсина (по 50 мкг/мл) и инкубируют 3 ч при 0—2°; при этом разрушаются все продукты реакции, находящиеся вне везикул. После осаждения ТХУ, электрофореза в ПААГ—ДСН и радиоавтографии или флюорографии можно определить, какие белки в этих условиях оказались устойчивы к протеолизу. Опыт должен включать негативный контроль (без обработки протеазой) и позитивный контроль (протеазная обработка реакционной смеси после добавления детергента).

В последние годы в исследовании переноса белков через мембраны in vitro был достигнут значительный успех. Например, оказалось возможным солюбилизировать сигнальную пептидазу путем обработки мембран шероховатого эндоплазматического ретикулума детергентами. Этот фермент ингибируется химостатином. Было также показано, что белок, узнающий сигнальную последовательность, связан с эндоплазматическим ретикулумом и участвует в избирательном связывании образующихся секреторных белков с мембранами при трансляции in vitro [35]. Этот белок в растворенном виде способен блокировать элонгацию полипептидных цепей, содержащих сигнальные

последовательности; в составе мембран он не оказывает такого действия. Все это свидетельствует об очень важной роли бесклеточных систем трансляции в изучении механизмов переноса белков через мембраны. К счастью, сигнальные последовательности и компоненты системы переноса, по-видимому, универсальны, что и способствовало успеху всех этих исследований. Так, мембраны из поджелудочной железы собаки с успехом использовались в системе из зародышей пшеницы при трансляции мРНК из столь экзотического источника, как островки поджелудочной железы морского черта [38].

6.2. Протеолиз первичных продуктов

Помимо отщепления N-концевых сигнальных последовательностей в присутствии микросомных мембран первичные продукты трансляции могут участвовать в бесклеточных системах и в других актах протеолитического процессинга. С этим чаще всего сталкиваются в случае «полибелков» ряда вирусов животных и растений, которые синтезируются в результате полной трансляции больших мРНК. Расщепление полипептидной цепи может происходить во многих специфических сайтах первичного продукта трансляции [19, 39]. Участвующие в этом протеазы представляют собой растворимые ферменты, отличные от связанной с мембранами сигнальной пептидазы; они могут присутствовать в системах трансляции в качестве эндогенного компонента (например, в лизате ретикулоцитов) [39]. Иногда они сами являются продуктами трансляции вирусной мРНК, которые образуются in vitro во время инкубации [39].

Для изучения кинетики сопряженного с трансляцией и посттрансляционного процессинга новообразованных продуктов в бесклеточных системах лучше всего следить за появлением и исчезновением определенных полипептидов с помощью электрофореза в ПААГ—ДСН и радиоавтографии или флюорографии материала, меченного [^{35}S]-метионином. Многие эксперименты основаны на импульсном мечении и импульсном разведении метки (для разведения используют избыток немеченого метионина) в течение различных промежутков времени. Добавление ингибиторов инициации, например эдеина или аналогов «кэпа», вскоре после введения мРНК позволяет синхронизировать инициацию белкового синтеза [36]. Если радиоактивную аминокислоту добавить после ингибитора инициации, то пометятся преимущественно пептидные последовательности вблизи С-конца продукта трансляции. Если вместо метионина использовать N-формил-[^{35}S]-метионил-тРНК$_f$ (разд. 7.1.1 и 7.2.1), то пометятся исключительно N-концевые пептиды. Чтобы блокировать процессинг первичных продуктов трансляции, можно использо-

вать специфические ингибиторы протеаз. С другой стороны, можно стимулировать протеолиз, если в системы трансляции добавлять клеточные экстракты, содержащие большое количество соответствующих ферментов. Именно этот подход часто применяется, когда для осуществления процессинга синтезированных in vitro вирусных белков добавляют гомологичные экстракты зараженных вирусом клеток [19].

При интерпретации картины распределения меченых полипептидов, полученной после электрофореза в ПААГ—ДСН, нужно быть весьма осмотрительным. Поскольку в некоторых бесклеточных системах наблюдается тенденция к преждевременной терминации синтеза полипептидов (разд. 4.6), при трансляции крупных индивидуальных мРНК может образоваться сложный набор продуктов (см., например, рис. 4). Появление таких неполных белков усложняет анализ продуктов протеолитического процессинга больших полибелков с образованием отдельных мелких белков или даже делает его невозможным. В системе лизата ретикулоцитов такой проблемы практически не возникает, поэтому она лучше всего подходит для большинства исследований этого типа.

7. Исследование регуляции трансляции с помощью бесклеточных систем

Эта глава посвящена в основном использованию бесклеточных белоксинтезирующих систем для изучения трансляции экзогенных мРНК и образующихся при этом продуктов, но такие системы можно использовать и для изучения самого механизма синтеза белка и его регуляции. В этой области накоплено огромное количество данных. Ниже приводятся некоторые примеры подобных исследований.

7.1. Лизат ретикулоцитов

Благодаря своей высокой активности система лизата ретикулоцитов была наиболее популярной моделью для изучения механизма синтеза белка у эукариот и многих аспектов регуляции трансляции. Ее популярности способствовали низкая эндогенная рибонуклеазная активность, высокое содержание рибосом и факторов инициации и тот факт, что основные продукты трансляции были хорошо охарактеризованы. К счастью, трансляция в лизате ретикулоцитов зависит от различных регуляторных факторов, например от присутствия гемина и низких концентраций двухцепочечной РНК; влияние этих факторов можно исследовать более подробно. Но чтобы говорить об универсальности полученных выводов, следует выяснить, насколько эта специализированная клетка типична для эукариотических клеток.

7.1.1. Образование комплексов инициации

В системе лизата ретикулоцитов можно сравнительно легко исследовать сборку различных комплексов, участвующих в инициации белкового синтеза: связывание инициаторной аминоацилированной метиониновой тРНК с фактором инициации eIF-2 в присутствии GTP, последующую ассоциацию такого тройного комплекса с нативной 40S-субчастицей и мРНК-зависимое присоединение 60S-субчастицы с образованием 80S-комплекса инициации. В любом случае исследование надо начинать с получения [^{35}S]-метионил-тРНК$_f$. Для этого берут неочищенную смесь аминоацил-тРНК—синтетаз из *Escherichia coli* и деацилированные тРНК из печени кролика. В табл. 16 описана методика получения ферментов, в табл. 17 — методика получения [^{35}S]-метионил-тРНК. Из всех тРНК млекопитающих бактериальные синтетазы способны ацилировать только тРНК$_f^{Met}$. После быстрой экстракции фенолом и диализа в течение ночи получается препарат метионил-тРНК$_f$ с радиоактивностью $(2—5)\cdot10^4$ имп/мин на 1 мкл. Если надо провести дополнительную очистку метионил-тРНК (например, удалить тРНК$_m^{Met}$ и примеси ингибиторов типа сульфатированных полисахаридов), это удобно сделать с помощью хроматографии на небольшой колонке с ДЭАЭ-цел-

Таблица 16. Выделение препарата аминоацил-тРНК — синтетаз *E. coli* [61]

1. Разотрите 5 г лиофилизированных клеток *E. coli* с 15 г окиси алюминия (тип 305) в присутствии достаточного количества буфера, чтобы получилась паста. Буфер содержит 10 мМ $MgCl_2$, 10%-ный глицерол и 10 мМ трис-HCl, pH 8,0.
2. Добавьте еще один объем буфера и отцентрифугируйте 5 мин при 700g, чтобы удалить окись алюминия.
3. Отцентрифугируйте супернатант 2 ч при 100 000g.
4. Нанесите супернатант на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (1×9 см), уравновешенную буфером для элюции:
   20 мМ 2-меркаптоэтанол
   1 мМ $MgCl_2$
   10%-ный глицерол
   20 мМ KH_2PO_4 (доведите pH до 7,5 раствором KOH)
5. Промойте колонку буфером для элюции, чтобы удалить несвязавшиеся белки.
6. Элюируйте аминоацил-тРНК — синтетазы буфером для элюции, в котором концентрация KH_2PO_4 увеличена до 0,25 М (доведите pH до 6,5 раствором KOH).
7. Соберите белок в пике и отдиализуйте его против следующего буфера:
   40 мМ 2-меркаптоэтанол
   10%-ный глицерол
   15%-ный ПЭГ-6000
   2 мМ KH_2PO_4 (доведите pH до 7,0 раствором KOH).
8. Добавьте к препарату равный объем глицерола и храните при —20 °С. Met-тРНК$_f$ — синтетаза в этих условиях остается активной в течение долгого времени.

Таблица 17. Получение [^{35}S]-Met-тРНК$_f$

1. Разведите следующие компоненты в конечном объеме 1 мл:
   50 мМ KCl
   8 мМ ацетат магния
   2 мМ ДТТ
   4 мМ АТР
   1 мМ GTP
   100 мкКи [^{35}S]-метионина (1100—1300 Ки/моль)
   50 мМ HEPES (доведите pH до 7,5 раствором KOH)
   1 мг деацилированной тРНК из печени теленка (Boehringer)
   80 мкл препарата аминоацил-тРНК — синтетаз *E. coli*[1]
2. Проинкубируйте 30 мин при 30 °С, затем охладите во льду, добавьте 0,1 мл 2 М ацетата натрия (pH 4,4) и 2 мл водонасыщенного фенола. Интенсивно встряхивайте в течение 5 мин при 4 °С.
3. Отцентрифугируйте 10 мин при 400*g* и отберите верхний (водный) слой.
4. Еще раз экстрагируйте фенольный слой, встряхивая его с 0,8 мл 50 мМ ацетата натрия, pH 5,0, 5 мМ ацетата магния.
5. Отцентрифугируйте, как указано в п. 3. Отберите водный слой и объедините с предыдущей водной фазой, полученной на этапе 3.
6. Проведите одну из следующих процедур.
   а. Диализуйте объединенные водные фазы в течение 6 ч против 0,5 М NaCl, 50 мМ ацетата натрия, pH 5,0, затем в течение 17 ч — против 20 мМ ацетата натрия, pH 5,0.
   б. Осадите тРНК 2,5 объемами этанола при —20 °С, отцентрифугируйте 10 мин при 10 000*g*, промойте осадок этанолом, высушите и растворите в 20 мМ ацетате натрия.
7. Храните препарат [^{35}S]-Met-тРНК$_f$ аликвотами по 0,1 мл при —70 °С.

[1] Приготовление этого препарата описано в табл. 16.

люлозой или с бензоилированной ДЭАЭ-целлюлозой. В последнем случае препарат метионил-тРНК наносят на колонку в буфере, содержащем 0,4 М NaCl при pH 5,0, и элюируют очищенную Met-тРНК$_f$, увеличив концентрацию соли до 0,5 М. Можно элюировать фракции и градиентом соли 0,4—1,0 М.

Если нужна N-формилметионил-тРНК$_f$ (например, для того, чтобы пометить N-концы новосинтезированных белков без последующего отщепления инициирующей аминокислоты), в реакционную смесь для аминоацилирования тРНК, состав которой указан в табл. 17, п. 1, добавляют 10 мкМ Са-лейковорин (фолиновую кислоту в 0,25 М HCl). Фолиновая кислота служит донором формильной группы в реакции, катализируемой еще одним ферментом, присутствующим в препарате синтетаз из *E. coli*. В этих условиях формилируется 70—80% метионил-тРНК.

За связыванием [^{35}S]-метионил-тРНК в составе тройного комплекса с eIF-2 и GTP можно следить в безрибосомных супернатантах лизатов ретикулоцитов по задержке радиоактивности на нитроцеллюлозных фильтрах [40]. Некоторые особенности такого связывания характерны только для eIF-2, и их

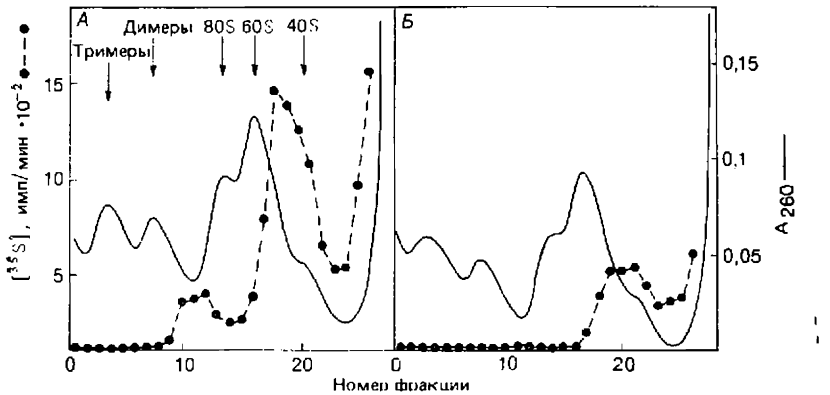


Рис. 5. Образование комплексов инициации 40S-субчастица·метионил-тРНК$_f$ в лизате ретикулоцитов. Инкубацию проводили в 150 мкл в условиях синтеза белка (табл. 4), но с добавлением циклогексимида (100 мкг/мл). Меченый предшественник [^{35}S]-метионил-тРНК$_f$ ($2{,}22 \cdot 10^5$ имп/мин) добавляли после предынкубации лизата в течение 35 мин при 30 °С. Через 2 мин реакцию останавливали, добавляя холодный буферный раствор (25 мМ KCl, 10 мМ NaCl, 1 мМ ацетат магния, 0,25 мМ ДТТ, 10 мМ трис-HCl, pH 7,6). Образцы центрифугировали через градиент сахарозы объемом 12,5 мл (20—40%) в том же буфере в течение 4,5 ч при 205 000 g. Градиент раскапывали на фракции, осаждали 1 мл 2%-ного (вес/объем) бромистого цетилтриметиламмония в присутствии 0,5 мг дрожжевой РНК-носителя, фильтровали через стекловолокнистые фильтры CF/C и определяли радиоактивность в сцинтилляционном счетчике. Положение 40S- и 60S-субчастиц, 80S-рибосом, димерных и тримерных полисом отмечено стрелками. *А* — контрольный лизат, *Б* — лизат, предынкубированный с препаратом репрессора, контролируемого гемом. Обратите внимание на присутствие комплексов инициации метионил-тРНК$_f$ с 40S- и 80S-субчастицами в опыте *А*. Они седиментируют в зоне с большей плотностью, образуя плечо у соответствующих пиков оптической плотности A_{260}. Связывание метионил-тРНК$_f$ с этими комплексами сильно ингибируется контролируемым гемом репрессором (действие которого основано на фосфорилировании фактора инициации eIF-2).

следует проверить, чтобы подтвердить специфичность связывания.

1. Связывание должно быть специфично для метионил-тРНК$_f$.
2. Образование комплекса должно зависеть от GTP и сильно ингибироваться GDP.
3. Фосфоенолпируват вместе с пируваткиназой, участвующие в регенерации GTP из GDP, увеличивают скорость и глубину реакции.

Чтобы изучить следующий этап процесса инициации — образование 40S-комплекса, — необходимо после инкубации фракционировать лизат в градиенте сахарозы. В подписи к рис. 5 описаны условия центрифугирования. Поскольку во время синтеза белка происходит быстрый обмен в комплексах 40S·eIF-2·метионил-тРНК$_f$, для максимального мечения этих комплексов

достаточно проинкубировать смесь с [^{35}S]-метионил-тРНК в течение всего 2 мин. Однако при нормальных условиях трансляции стационарная концентрация этих комплексов весьма мала; для ее увеличения можно блокировать элонгацию полипептидов, например циклогексимидом (см. подпись к рис. 5). В этих условиях происходит накопление 40S-комплексов, поскольку они не могут участвовать в синтезе белка, причем концентрация этих комплексов определяется, по-видимому, количеством активного eIF-2 в системе.

В условиях синтеза белка инициаторные 40S-комплексы быстро переходят в более крупные комплексы, и каждый из них ассоциирует с какой-нибудь молекулой мРНК и 60S-субчастицей. В обычном лизате бóльшая часть мРНК находится в составе полисом, поэтому обнаружить образование комплекса 80S·Met-тРНК$_f$·мРНК трудно. Но когда элонгация подавлена, можно превратить 40S-комплексы в 80S-комплексы добавлением экзогенной мРНК. Этот подход лежит в основе так называемого метода «смещения равновесия», описанного в работе [41]. Элегантность этого метода состоит в том, что он позволяет определять связывание мРНК, используя в качестве меченого соединения [^{35}S]-метионил-тРНК. Конечно, если есть радиоактивно меченная РНК, можно использовать и ее; еще один способ обнаружения poly(A)$^+$-РНК состоит в гибридизации с [^{3}H]-poly(U) [42]. В этих случаях для разделения и количественного определения образовавшихся комплексов также используют центрифугирование в градиенте сахарозы (рис. 5).

7.1.2. Механизмы действия ингибиторов белкового синтеза

Система лизата ретикулоцитов широко использовалась для изучения механизмов действия ингибиторов белкового синтеза in vitro. В частности, много внимания было уделено действию специфических протеинкиназ, например репрессору, который регулируется гемом, и ингибитору, который активируется двухцепочечной РНК [43]. Эти ферменты подавляют инициацию синтеза полипептидной цепи, фосфорилируя α-субъединицу eIF-2 с мол. массой 38 кДа. Кроме того, они подвергаются автофосфорилированию. Эти реакции фосфорилирования легко обнаружить, если проинкубировать лизаты в присутствии [γ-^{32}P]-АТР и проанализировать меченые белки с помощью одно- или двумерного электрофореза в ПААГ и/или изоэлектрического фокусирования с последующей радиоавтографией [44]. Эти методы позволяют работать с полными лизатами [44], с фракцией, осажденной при pH 5 [45], или с eIF-2, частично очищенным хроматографией на фосфоцеллюлозе [46]. Действие киназ eIF-2 на инициацию изучали с помощью подходов, описанных в разд. 7.1.1.

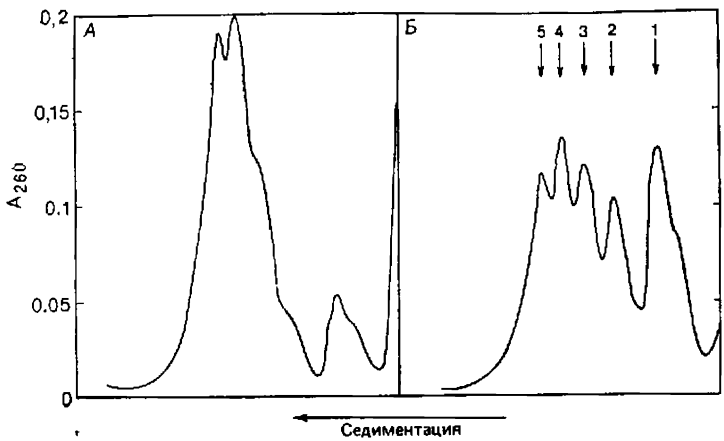


Рис. 6. Деградация полисом под действием эндонуклеазы, активируемой 2′,5′-олигоаденилатом в лизате ретикулоцитов. *А*. Лизаты инкубировали 25 мин при 30 °С в реакционной смеси объемом 100 мкл в присутствии всех компонентов, необходимых для синтеза белка, но с добавлением циклогексимида в концентрации 100 мкг/мл. *Б*. Реакционная смесь имеет тот же состав, что и в опыте *А*, но с добавлением 2′,5′-олигоаденилата (15 нМ). Инкубацию прерывали добавлением 250 мкл ледяного буфера (0,1 М KCl, 5 мМ ацетат магния, 20 мМ трис-HCl, pH 7,6) и образцы анализировали центрифугированием в градиентах сахарозы объемом 5 мл (20—50%) в том же буфере (35 мин при 233 000 *g*). Для измерения оптической плотности при 260 нм градиенты пропускали через проточный денситометр (длина оптического пути 10 мм, объем кюветы 80 мкл). Пики, соответствующие положению одиночных рибосом и полисом, содержащих 2—5 рибосом, отмечены стрелками на рис. *Б*. Обратите внимание, что под действием 2′,5′-олигоаденилатзависимого расщепления полисомы, содержащие в основном 4—5 рибосом, превращаются в структуры из 1—3 рибосом. Подробнее см. в работе [47].

Другой класс ингибиторов с совершенно другим механизмом действия — ряд 2′,5′-олигоаденилатов. Механизм ингибирования (путем активации специфической эндонуклеазы [47]) можно продемонстрировать с помощью следующего эксперимента. Лизаты инкубируют в присутствии высоких концентраций циклогексимида или эметина, чтобы предупредить распад полисом из-за «соскальзывания» рибосом, и анализируют полисомы центрифугированием в градиенте сахарозы. Рис. 6 демонстрирует, как в этих условиях под действием 2′,5′-олигоаденилата уменьшается размер полисом. Чувствительность синтеза белка к ингибированию двухцепочечной РНК в системе лизата ретикулоцитов объясняется тем, что в ней содержится некоторое количество эндогенной 2′,5′-олигоаденилатсинтетазы, а также eIF-2-киназа, активируемая двухцепочечной РНК.

Помимо уже упомянутых гемина и двухцепочечной РНК, лизаты ретикулоцитов на удивление чувствительны к некоторым

типам веществ. Среди них следует отметить окисленные тиолы, которые ингибируют трансляцию по механизму, сходному с тем случаем, когда в системе не хватает гемина. К ингибиторам синтеза белка в ретикулоцитах относятся также различные низкомолекулярные РНК с неустановленной функцией, аналоги «кэпа» на 5′-концах большинства мРНК [50], а также ДНК, комплементарные присутствующим в системе мРНК и блокирующие их использование по механизму, названному «трансляцией, остановленной образованием гибрида» (hybrid-arrested translation) [51].

Описанные выше подходы позволяют подробно исследовать действие всех этих агентов, а также любых других ингибиторов белкового синтеза. При интерпретации результатов экспериментов следует руководствоваться следующими общими соображениями.

1. Ингибиторы инициации вызывают распад полисом только в условиях синтеза белка.
2. Ингибиторы элонгации и терминации нарушают синтез белка, не вызывая распада полисом, и могут даже стимулировать образование более крупных полисом, чем в контроле («рибосомная перегрузка»).
3. Эндонуклеазы вызывают распад полисом независимо от того, идет ли синтез белка.

7.2. Экстракты культур клеток и тканей

Для многих работ по трансляции система лизата ретикулоцитов непригодна. Как отмечалось в разд. 7.1, ретикулоциты не обязательно отражают типичные свойства всех эукариотических клеток в отношении регуляции трансляции. Ведь они представляют собой, в конце концов, высокоспециализированные клетки. К тому же они не отвечают на многие физиологические сигналы (например, на гормоны), которые являются важными регуляторами функций в других клетках, и не могут использоваться для изучения вирусной инфекции. По этим причинам многие работы по регуляции трансляции проводятся на экстрактах других клеток, несмотря на определенные недостатки и трудности, присущие некоторым из этих систем (разд. 7.2.3).

7.2.1. Образование комплексов инициации

Бесклеточные системы, полученные из самых разнообразных клеток и тканей, с успехом использовались для исследования сборки комплексов инициации с участием нативных рибосомных 40S-субчастиц и 80S-рибосом, а также регуляции этой сборки. К настоящему времени эти исследования были прове-

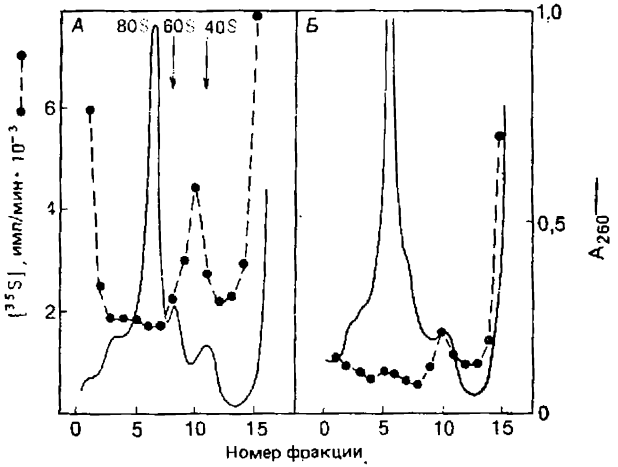


Рис. 7. Образование комплексов инициации 40S-субчастица·метионил-тРНК в экстрактах клеток асцитной опухоли Эрлиха, растущих на полноценной среде или в условиях дефицита аминокислот. Инкубацию проводили в 100 мкл в условиях синтеза белка на эндогенной мРНК (разд. 4.3). Концентрация [^{35}S]-метионина — 250 мкКи/мл. Через 2 мин инкубации при 30 °С реакцию останавливали быстрым охлаждением и образцы центрифугировали в градиентах сахарозы объемом 5 мл (20—50%) 3 ч при 233 000 *g*. Собирали фракции и определяли в них радиоактивность, как описано в подписи к рис. 5. Стрелками отмечено положение 40S- и 60S-субчастиц и 80S-рибосом. *А* — экстракт экспоненциально растущих клеток, получающих полноценное питание; *Б* — экстракт клеток, голодавших по лизину в течение 30 мин перед получением экстракта. Обратите внимание на наличие меченого материала в верхней части градиента (свободная метионил-тРНК$_i$) и в нижней его части (новообразованные полипептидные цепи), а также в составе 40S-комплексов. Аминокислотное голодание подавляет образование таких комплексов путем инактивации фактора eIF-2. Подробнее см. в оригинальной работе [21].

дены на клетках асцитной опухоли Кребс II [52], асцитной опухоли Эрлиха [14, 21], мышиных L-клетках [47], клетках HeLa [53], CHO [54], миеломы [53], нормальных и стимулированных митогенами лимфоцитах [55], клетках печени и мышц (C. Harmon, V. M. Pain, University of Sussex, неопубликованные данные) и на дрожжах [56]. По-видимому, во всех этих системах фактор инициации eIF-2 активен и способен связывать метионил-тРНК$_i$ с 40S-субчастицей. В некоторых случаях концентрация 40S-комплексов становится сравнимой с их уровнем in vivo [14, 57]. Более того, нередко активность инициации в экстрактах отражает физиологические изменения, происходящие в клетках. Например, инициация синтеза белка в культурах клеток регулируется такими факторами, как нехватка незаменимых аминокислот, вирусная инфекция и обработка интерфероном, и все эти эффекты можно исследовать на соответствующих экстрактах

[58]. Во многих случаях добавление eIF-2 к бесклеточному экстракту обращает подавление инициации, вызванное физиологическими воздействиями. Сходные наблюдения были сделаны на экстрактах из мышц крысы, в которых инициация изменяется при диабете или голодании (C. Harmon, V. M. Pain, University of Sussex, неопубликованные данные).

Для изучения этих явлений используют в основном те же методы, что и в случае лизата ретикулоцитов (разд. 7.1.1). Чтобы пометить in vitro 40S-комплексы инициации (а в некоторых случаях и 80S-комплексы), можно использовать [^{35}S]-метионил-тРНК$_f$ или свободный [^{35}S]-метионин. Если взять [^{35}S]-метионин, эндогенные аминоацил-тРНК—синтетазы будут аминоацилировать и тРНК$_f^{Met}$, и тРНК$_m^{Met}$, так что в условиях синтеза белка метка будет включаться также и в новообразованные полипептидные цепи. Однако их легко отделить от 40S-комплексов центрифугированием в градиенте сахарозы. На рис. 7 показан результат типичного эксперимента, в котором с помощью этого метода сравнивали инициацию в экстрактах из клеток асцитной опухоли Эрлиха при содержании на полноценной среде и в условиях аминокислотного голодания. Следует отметить, что при использовании экстрактов, не подвергнутых диализу или фракционированию на сефадексе, удельная радиоактивность меченого метионина снижается из-за наличия эндогенного пула аминокислот. Следует ввести поправку на этот эффект, проведя эксперименты по изотопному разведению или по прямому аминокислотному анализу экстрактов.

7.2.2. Изучение трансляции матричной РНК

Бесклеточные системы из различных источников можно также использовать для изучения процесса трансляции в целом. Например, если речь идет об эндогенной мРНК, часто бывает необходимо определить, какую долю в синтезе составляет «доиспользование» рибосом в предсуществовавших полисомах, а какую — инициация in vitro. Для того чтобы различить эти два процесса, можно определить кинетику включения аминокислот в присутствии и в отсутствие ингибитора инициации. На рис. 8 приведен результат такого эксперимента. Важно, чтобы ингибитор не влиял на элонгацию и терминацию; для этой цели хорошо подходит антибиотик эдеин, который имеется в продаже. Можно использовать также пактамицин (при концентрации 10 мкМ) или нетранслируемый гомополинуклеотид, например полиинозиновую кислоту (400 мкг/мл).

При работе с экзогенными мРНК, особенно в случае предынкубированных и/или обработанных микрококковой нуклеазой экстрактов, можно провести опыты по конкуренции мРНК.

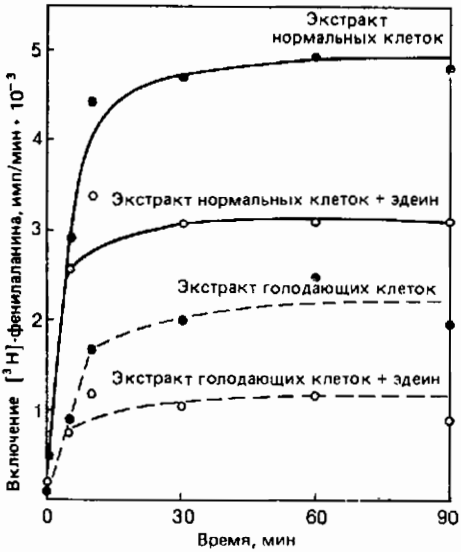


Рис. 8. Действие ингибитора инициации трансляции на кинетику синтеза белка на эндогенной мРНК в экстрактах из клеток асцитной опухоли Эрлиха, растущих на полной среде и в условиях аминокислотного голодания. Реакционную смесь в объеме 50 мкл инкубировали, как указано в подписи к рис. 7, с меченым предшественником [³H]-фенилаланином (50 мкКи/мл) в присутствии или в отсутствие эдеина (4 мкМ). Через указанные промежутки времени отбирали аликвоты объемом 5 мкл и измеряли радиоактивность, включившуюся в белок. Обратите внимание на быстрое прекращение синтеза белка даже в отсутствие эдеина и на то, какая часть аминокислот включается в белок в результате инициации новых полипептидных цепей (общее включение за вычетом включения в присутствии эдеина).

Этот подход оказался особенно полезен при исследовании, например, взаимоотношений вирусных и хозяйских клеточных мРНК или для определения относительной эффективности трансляции различных мРНК в разных ионных условиях [59]. В таких исследованиях важно, конечно, иметь специфический тест на трансляцию каждой отдельной матрицы. Для этой цели широко используется анализ продуктов с помощью электрофореза в ПААГ—ДСН (разд. 5.2).

7.2.3. Проблемы и ограничения

Основной недостаток при использовании клеточных экстрактов для изучения физиологических изменений в клетках или тканях заключается в том, что по сути исследуют свойства экстрактов, а не самих клеток. Очевидно, что получение бесклеточных систем само по себе вносит определенные артефакты. По-

следствия этих артефактов следует соотнести с преимуществами проведения таких экспериментов, которые невозможны на интактных клетках или целых животных. Серьезным недостатком являются низкая трансляционная активность многих систем (разд. 4.6) и непродолжительность времени, в течение которого наблюдается инициация на эндогенной РНК (рис. 8); эти проблемы требуют решения. Следует обратить внимание также на технические недостатки бесклеточных систем — кажущееся запасание мРНК в нетранслируемом виде и заметное расхождение между способностью некоторых систем из неэритроидных клеток млекопитающих образовывать комплексы инициации 40S-метионил-тРНК$_f$ и способностью мРНК связываться с этими комплексами.

Еще одна сложная проблема — отсутствие реакции некоторых клеточных экстрактов на регуляторные сигналы, которые быстро и эффективно действуют на интактные клетки. Особенно загадочно различие в реакции клеток, подвергнутых аминокислотному голоданию, и экстрактов из них на восстановление концентрации недостающих аминокислот [60]. В целых клетках синтез белка регулируется на уровне инициации и при добавлении аминокислот восстанавливается в течение нескольких минут. В экстрактах из голодающих клеток добавление аминокислот, наоборот, совершенно не эффективно, хотя экзогенный фактор eIF-2 способен восстановить инициацию [14].

Возможно, установив причины всех этих особенностей в поведении бесклеточных эукариотических систем, мы не только решим технические проблемы, но и больше узнаем о механизме синтеза белка у эукариот и его регуляции.

Благодарности

Я очень признателен многим коллегам, сообщившим мне полезные сведения о практических аспектах выделения и трансляции мРНК. Особенно я хотел бы поблагодарить Т. Ханта, Р. Джексона и С. Морли (Кембриджский университет) за предоставление неопубликованных данных и лабораторного руководства «Система трансляции лизата ретикулоцитов кролика». Я также благодарен д-рам Э. Хеншоу и Р. Паннирсу (Раковый центр Университета в Рочестере) за возможность ознакомиться с рукописью их статьи (Methods in Enzymology, в печати). Часть представленных здесь данных была получена в сотрудничестве с д-рами С. Остин, М. Мак-Нурлан, Дж. Круппа, Б. Уильямсом и И. Керром. Я благодарен В. Тийерей и З. Бериджу за техническую помощь, Б. Бэшфорду за выполнение рисунков и В. Марвелл за подготовку рукописи. Эта работа фи-

нансировалась Career Development Award from the Cancer Research Campaign and by grants from the Medical Research Council and the Anna Fuller Fund.

Литература

1. *Clemens M. J. ed.* The Biochemistry of Cellular Regulation, vol. I, CRC Press, Boca Raton, p. 159, 1980.
2. *Jackson R. J., Campbell E. A., Herbert P., Hunt T.* Eur. J. Biochem., **131**, 289 (1983).
3. *Pelham H. R. B., Jackson R. J.* Eur. J. Biochem., **67**, 247 (1976).
4. *Skup D., Millward S.* Nucleic Acids Res., **4**, 3581 (1977).
5. *Palmiter R. D.* J. Biol. Chem., **248**, 2095 (1973).
6. *Pelham H. R. B., Sykes J. M. M., Hunt T.* Eur. J. Biochem., **82**, 199 (1978).
7. *Cepko C. L., Hansen U., Handa H., Sharp P. A.* Mol. Cell Biol., **1**, 919 (1981).
8. *Kay J. E., Benzie C. R.* Biochim. Biophys. Acta, **698**, 218 (1982).
9. *Roberts B. E., Paterson B. M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**, 2330 (1973).
10. *Marcu K., Dudock B.* Nucleic Acids Res., **1**, 1385 (1974).
11. *Kronenberg H. M., Roberts B. E., Habener J. F., Potts J. T., Rich A.* Nature, **267**, 804 (1977).
12. *Senger D. R., Gross P. R.* Dev. Biol., **53**, 128 (1976).
13. *Mathews M. B.* Biochim. Biophys. Acta, **272**, 108 (1972).
14. *Pain V. M., Lewis J. A., Huvos P., Henshaw E. C., Clemens M. J.* J. Biol. Chem., **255**, 1486 (1980).
15. *Henshaw E. C., Panniers L. R. V.* In: Methods in Enzymology, vol. 101, Wu R., Grossman L. and Moldave K. (eds.), p. 616, 1983.
16. *Tuite M. F., Plesset J., Moldave K., McLaughlin C. S.* J. Biol. Chem., **255**, 8761 (1980).
17. *Schreier M. H., Staehelin T.* J. Mol. Biol., **73**, 329 (1973).
18. *Trachsel H., Erni B., Schreier M. H., Staehelin T.* J. Mol. Biol., **116**, 755 (1977).
19. *Esteban M., Kerr I. M.* Eur. J. Biochem., **45**, 567 (1974).
20. *Weber L. A., Feman E. R., Baglioni C.* Biochemistry (Wash.), **14**, 5315 (1975).
21. *Austin S. A., Clemens M. J.* Eur. J. Biochem., **117**, 601 (1981).
22. *Hames B. D., Rickwood D., eds.* Gel Electrophoresis of Proteins, IRL Press Ltd., Oxford and Washington, DC, 1981.
23. *Dobos P., Kerr I. M., Martin E. M.* J. Virol., **8**, 491 (1971).
24. *Heywood S. M., Rourke A. W.* In: Methods in Enzymology, vol. 30, Moldave K. and Grossman L. (eds.), Academic Press, New York and London, p. 669, 1974.
25. *Woodward W. R., Wilairat P., Herbert E.* In: Methods in Enzymology, vol. 30, Moldave K. and Grossman L. (eds.), Academic Press, New York and London, p. 740, 1974.
26. *Devillers-Thiery A., Kindt T., Scheele G., Blobel G.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 5016 (1975).
27. *Smith A. E.* Eur. J. Biochem., **33**, 301 (1973).
28. *Wigle D. T., Smith A. E.* Nature New Biol., **242**, 136 (1973).
29. *Raj N. B. K., Pitha P. M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 1483 (1977).
30. *Hruby D. E., Ball P. M.* J. Virol., **40**, 456 (1977).
31. *Davis B. D., Tai P.-C.* Nature, **282**, 433 (1980).
32. *Sabatini D., Kreibich G., Morimoto T., Adesnik M.* J. Cell Biol., **92**, 1 (1982).
33. *Blobel G., Dobberstein B.* J. Cell Biol., **67**, 852 (1975).

34. *Strauss A. W., Zimmerman M., Boime I., Ashe B., Mumford R. A., Alberts A. W.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 4225 (1979).
35. *Waller P., Ibrahimi I., Blobel G.* J. Cell Biol., **91**, 545 (1981).
36. *Rotham J. E., Lodish H. F.* Nature, **269**, 775 (1977).
37. *Scheele G., Dobberstein B., Blobel G.* Eur. J. Biochem., **82**, 593 (1978).
38. *Shields D., Blobel G.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 2059 (1977).
39. *Pelham H. R. B.* Eur. J. Biochem., **85**, 457 (1978).
40. *Proud C. G., Clemens M. J., Pain V. M.* FEBS Lett., **148**, 214 (1982).
41. *Darnbrough C., Legon S., Hunt T., Jackson R. J.* J. Mol. Biol., **76**, 379 (1973).
42. *Jagus R., Safer B.* J. Biol. Chem., **254**, 6865 (1979).
43. *Austin S. A., Clemens M. J.* FEBS Lett., **110**, 1 (1980).
44. *Farrell P. J., Balkow K., Hunt T., Jackson R. J., Trachsel H.* Cell, **11**, 187 (1977).
45. *Leroux A., London I. M.* Proc. Natl. Acad. Sci USA, **79**, 2147 (1982).
46. *Wong S.-T., Mastropaolo W., Henshaw E. C.* J. Biol. Chem., **257**, 5231 (1982).
47. *Clemens M. J., Williams B. R. G.* Cell, **13**, 565 (1978).
48. *Williams B. R. G., Gilbert C. S., Kerr I. M.* Nucleic Acids Res., **6**, 1335 (1979).
49. *Sarkar S., Mukherjee A. K., Guha C.* J. Biol. Chem., **256**, 5077 (1981).
50. *Fresno M., Vazquez D.* Eur. J. Biochem., **103**, 125 (1980).
51. *Hastie N. D., Held W. A.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 1217 (1978).
52. *Austin S. A., Kay J. E.* Biochim. Biophys. Acta, **395**, 468 (1975).
53. *Lenz J. R., Chatterjee G. E., Maroney P. A., Baglioni C.* Biochemistry (Wash.), **17**, 80 (1978).
54. *Fischer J., Moldave K.* Anal. Biochem., **113**, 13 (1981).
55. *Ahern T., Sampson J., Kay E.* Nature, **248**, 519 (1974).
56. *Gasior E., Herrera F., McLaughlin C. S., Moldave K.* J. Biol. Chem., **254**, 3970 (1979).
57. *Pain V. M., Henshaw E. C.* Eur. J. Biochem., **57**, 335 (1975).
58. *Austin S. A., Kay J. E.* In: Essays in Biochemistry, vol. 18, Campbell P. N. and Marshall R. D. (eds.), The Biochemical Society London, p. 79, 1982.
59. *Brendler Y., Godefroy-Colburn T., Carlill R. D., Thach R. E.* J. Biol. Chem., **256**, 11747 (1981).
60. *Austin S. A., Pain V. M., Lewis J. A., Clemens M. J.* Eur. J. Biochem., **122**, 519 (1982).
61. *RajBhandary U. L., Ghosh H. P.* J. Biol. Chem., **244**, 1104 (1968).

ТРАНСЛЯЦИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ МАТРИЧНОЙ РНК В ООЦИТАХ *XENOPUS*

А. Колмен

1. Введение

Во время оогенеза в ооцитах *Xenopus laevis* накапливается большое количество ферментов, запасных белков и органелл, образующих материнский резерв для использования во время раннего развития эмбриона. Одна из поразительных черт раннего развития — резкое увеличение синтеза белка в результате интенсивной трансляции материнской мРНК после оплодотворения. Неудивительно, что значительную часть материнских запасных молекул представляют компоненты, необходимые для этого трансляционного взрыва, например рибосомы, тРНК и т. д. [1, 2]. Но большая часть материнского резерва состоит из белков желтка, фосвитина и липовителлина. Именно накоплением больших количеств этих белков (~200 мкг на ооцит), поступающих из материнской крови, объясняются впечатляющие размеры зрелого ооцита *X. laevis* (диаметр ~1,2 мм). Эти два свойства ооцита — наличие материнского резерва и крупные размеры — сделали его популярной тест-системой в исследованиях транскрипции [3], репликации [4], самосборки [5], распределения [6] и трансляции [7—10] инъецированных макромолекул. Настоящая глава посвящена способности ооцита транслировать инъецированную мРНК. Транскрипция ДНК, инъецированной в ооциты, описана в гл. 2.

Инъецированные мРНК транслируются в ооцитах *Xenopus* весьма эффективно. Это было впервые продемонстрировано Джоном Гердоном и его коллегами [11], которые наблюдали в ооцитах синтез глобинов после инъекции в них 9S-РНК из ретикулоцитов кролика. По оценке этих авторов, мРНК транслировались в ооците в 30 раз более эффективно, чем в лизате ретикулоцитов за такое же время инкубации. Более того, эту разницу между эффективностью ооцита и лизата можно было довести до 1000, просто культивируя ооциты достаточно долго. С тех пор было транслировано с помощью инъекции в ооциты множество самых различных РНК (табл. 1). В первой работе по синтезу глобина радиоактивный продукт — глобин — идентифицировали колоночной хроматографией. Хотя подобные приемы к настоящему времени большей частью вытеснены иммунологическими и электрофоретическими методами, прямое радио-

Таблица 1. РНК, транслированные с помощью микроинъекции в ооциты *Xenopus*[1]

Источник мРНК	Источник данных
Вирусы	
Аденовирус	[12]
Вирус мозаики альфальфа	[13]
Вирус миелобластоза птиц	[14]
Вирус саркомы птиц	[15]
Вирус мозаики ячменя	[16]
Вирус бычьего лейкоза	[17]
Вирус мозаики костра	[18]
Вироид томатов	[19]
Вирус мозаики огурца	[20]
Вирус энцефаломиокардита	[21]
Вирус гриппа	Неопубликованные данные[2]
Менговирус	[22]
Вирус Молони	[23]
Вирус опухоли молочной железы мыши	[24]
Вирус полиомы	[25]
Вирус бешенства	[26]
Реовирус	[27]
Обезьяний вирус 40	[25]
Вирус табачной мозаики	[28]
Растения	
Секреторные белки ячменя	[25]
Лектин клещевины	Неопубликованные данные[3]
Запасные белки фасоли (*Phaseolus vulgaris*)	[29]
Запасные белки кукурузы	[30]
Беспозвоночные	
Промелитин пчелы	[31]
Вителлины саранчи	[32]
Гистоны морского ежа	[33]
Позвоночные	
α- и β-Кристаллины хрусталика быка	[34, 35]
Прохимозин быка	Неопубликованные данные[4]
Тироглобулин быка	[36]
Проинсулин карпа	[37]
Ацетилхолиновый рецептор кошки	[38]
Кональбумин курицы	[39]
Лизоцим курицы	[39]
Овальбумин курицы	[39, 40]
Овомуконд курицы	[39]
Глобин утки	[41]
Альбумин лягушки	[25]
Вителлогенин лягушки	[25, 32]
Коллаген лягушки	[42]

Продолжение

Источник мРНК	Источник данных
Казеины морской свинки	[43]
α-Лактальбумин морской свинки	[43]
Иммуноглобулин человека	Неопубликованные данные[5]
Интерферон человека	[44]
Хорионический гонадотропин человека	[45]
Глобин мыши	[41]
Интерферон мыши	[46]
Коллаген мыши	[7]
Иммуноглобулин мыши	[47—50]
β-Глюкуронидаза мыши	[51]
Тиротропин мыши	[52]
Иммуноглобулин свиньи	[53]
Глобин кролика	[11]
Утероглобулин кролика	[54]
Иммуноглобулин крысы	[55]
Цитохром крысы	[56]
Эпоксидгидратаза крысы	[56]
Белки семенных пузырьков крысы	[57]
Стероидсвязывающий белок предстательной железы крысы	[58]
Ацетилхолиновый рецептор электрического ската	[59]
Протамин форели	[60]

[1] Более полный перечень источников даных см. в [7—10].
[2] Colman A., Dimmock N. Davey J.
[3] Colman A., Lord J. M.
[4] Colman A., Doel M., Harris T.
[5] Colman A., Williamson A.

Таблица 2. Посттрансляционные модификации чужеродных белков в ооцитах *Xenopus*[1]

Модификация	Модифицируемый белок[1]	Источник данных
α-NH_2-ацетилирование	Кристаллин αA2 хрусталика теленка	[34]
ε-NH_2-ацетилирование	Гистоны морского ежа	[33]
N-гликозилирование	Овальбумин курицы	[39]
	Иммуноглобулины мыши	[47]
Гидроксилирование	Коллаген фибробластов мыши	[7]
Фосфорилирование	Протамин семенников форели	[60]
Расщепление полибелка	Вителлогенин *Xenopus*	[61]
Ковалентная сборка субъединиц	Утероглобулин кролика	[54]
	Иммуноглобулины из различных источников	[48, 49, 55]
Нековалентная сборка субъединиц	Ацетилхолиновый рецептор *Torpedo*	[59]
Удаление сигнальной последовательности	Различные белки	См. сноски в табл. 3

[1] Приведены лишь отдельные примеры каждого типа модификаций.

Таблица 3. Правильная компартментация и секреция чужеродных белков, синтезированных в ооцитах *Xenopus* в результате инъекции мРНК

Белок	Окончательная локализация	Источник данных
Белки, остающиеся внутри ооцита		
Эпоксидгидратаза печени крысы	Мембраны ооцита	[56]
Цитохром Р-450 печени крысы	То же	[56]
Запасные белки кукурузы	»	[30]
Запасные белки фасоли	»	[29]
Несекретируемый иммуноглобулин мыши[1]	»	[48]
Лектин клещевины[1]	»	Неопубликованные данные[2]
Рецептор ацетилхолина	»	[38, 59]
Большой опухолевый антиген полиомы	Ядро ооцита	[25]
Нуклеопротеин вируса гриппа	То же	Неопубликованные данные[3]
Фосвитин печени *Xenopus*	Желточная пластинка ооцита	[61]
Липовителлин печени *Xenopus*	То же	[61]
Белки, секретирующиеся из ооцита		
Низкомолекулярные белки семян ячменя		[25]
Прохимозин быка[1]		Неопубликованные данные[4]
Овальбумин курицы		[39]
Кональбумин курицы		[39]
Овомукоид курицы		[39]
Лизоцим курицы[1]		[39]
Казеины морской свинки		[62]
Интерфероны человека		[62]
Вителлиновые полипептиды саранчи		[25]
Интерфероны мыши		[46]
Тироидстимулирующий гормон мыши		[52]
Иммуноглобулины мыши[1]		[48—50]
Альбумин крысы		[25]
Белки семенных пузырьков крысы[1]		[57]

[1] Показано, что в ооците происходит отщепление сигнальных последовательностей.
[2] Colman A., Lord J. M.
[3] Colman A., Dimmock N.
[4] Colman A., Harris T., Doel M.

Таблица 4. Обнаружение с помощью биологических тестов чужеродных белков, синтезированных в ооцитах

Белок	Биологический тест	Источники данных
Интерфероны (различные)	Подавление активности вирусов	[44, 46, 62]
Иммуноглобулины (различные)	Связывание антигена	[50, 55]
β-Глюкуронидаза почек мыши	Ферментативная активность	[51]
Ацетилхолиновые рецепторы электрического органа ската и мышц кошки	Связывание α-бунгаротоксина	[38, 59]
Вителлогенин *Xenopus*	Поглощение ооцитами	[32]
Цитохром Р-450 печени крысы	Ферментативная активность	[56]
Антигенспецифические супрессорные факторы мыши	Супрессорная активность	[63]

активное мечение чужеродного белка остается наиболее широко распространенным подходом.

Для большинства повседневных опытов по изучению мРНК бесклеточные экстракты являются самой простой и дешевой системой трансляции. Но в некоторых случаях ооциты *Xenopus* имеют очевидные преимущества перед бесклеточными системами. Так, в отличие от бесклеточных систем в ооците проходят правильные посттранскрипционные модификации многих чужеродных белков, например процессинг предшественников, фосфорилирование и гликозилирование (табл. 2). Кроме того, в ооците белки способны встраиваться в те внутриклеточные мембраны, для которых они предназначены, а секретируемые белки могут экспортироваться (табл. 3). Наконец, биологически активные чужеродные белки, синтезированные в ооцитах, могут обладать своей природной активностью, даже если для этого необходимы сложные взаимодействия субъединиц. В подобных случаях для выявления продукта трансляции можно использовать какой-нибудь подходящий биологический тест, обеспечивающий бо́льшую чувствительность, чем обычный радиохимический анализ (табл. 4).

2. Получение и подготовка ооцитов для микроинъекций

2.1. Покупка и содержание *Xenopus laevis*

2.1.1. Покупка

Естественное место обитания лягушек *X. laevis* — Южная Африка. Мы издавна покупали лягушек у южноафриканских фирм, поскольку «дикие» животные крупнее и часто находятся

в лучшем состоянии, чем выведенные в лабораторных условиях. Однако если нужно лишь немного лягушек (<20), то оплата ухода за ними, воздушной перевозки и т. п. делают их импорт экономически невыгодным. К счастью, фирмы нескольких стран предлагают покупателю на выбор выведенных в лаборатории, содержавшихся в лаборатории или «диких» животных, например South African Snake Farm, Xenopus Ltd., Nasco. Адреса этих фирм даны в приложении II. Заказывая животных, не забудьте указать, какого пола лягушки вам требуются!

2.1.2. Содержание лягушек

Лягушек содержат в больших резервуарах с водой (3—4 л на одно животное). Глубина должна быть не больше 15 см, так как лягушки должны время от времени всплывать к поверхности, чтобы дышать. Проверьте, чтобы резервуары имели плотно прилегающие крышки (лучше всего из мягкой пластиковой сетки), иначе животные выскочат. Лишенные воды лягушки погибают от обезвоживания через 6 ч. Оптимальная температура воды $\simeq$19—21 °С. Можно использовать водопроводную воду, но необходимо избавиться от хлора и тяжелых металлов, если они присутствуют в высокой концентрации. Для этого достаточно оставить воду на 24 ч в широких открытых емкостях (чтобы улетучился хлор) или пропустить ее через ионообменную колонку для удаления тяжелых металлов.

2.1.3. Кормление

Лягушек достаточно кормить всего два раза в неделю. По нашему опыту лучший рацион включает грубо измельченную говядину в одно кормление и живых личинок мясных мух — в другое. Очищайте резервуары после каждого кормления или еще чаще, если вода темнеет. Фирма Xenopus Ltd. продает корм строго определенного состава («гранулы для лягушек», «frog pellets»), но переход лягушек на этот корм занимает очень много времени, лучше всего приучать к нему на протяжении всего роста. Такой режим кормления не всегда возможен, если имеют дело с «дикими» лягушками. Подробнее с разведением и содержанием *Xenopus* можно ознакомиться в статье Гёрдона и Вудлэнда [64].

2.2. Извлечение ткани яичника из *Xenopus*

Зрелая самка *Xenopus* имеет около 30 000 крупных ооцитов диаметром более 1 мм. Поскольку обычно для эксперимента требуется не более 500—1000 ооцитов, было бы слишком расто-

чительным убивать лягушку ради одного эксперимента. Более того, в некоторых случаях оказалось крайне желательным время от времени повторно использовать одну и ту же самку, поскольку содержание некоторых компонентов в ооците варьирует у разных лягушек [65]. Однако если планируется провести несколько экспериментов или необходимы другие ткани данной лягушки, ее придется забить.

2.2.1. Ограниченное изъятие ооцитов под наркозом

1. Анестезируйте крупную самку *Xenopus*, погрузив ее на 15—30 мин в 0,1%-ный раствор этил-*м*-аминобензоата (он также называется трикаин, или MS 222) в воде. Во время этой процедуры наденьте перчатки, так как это соединение — потенциальный канцероген.

2. После того как лягушка заснула, поместите ее на плоскую поверхность и сделайте небольшой надрез (длиной около 1 см) с брюшной стороны через свободно прилегающую кожу и стенку брюшной полости в задней части тела, как показано на рис. 1. В результате этой операции открывается доступ к яичнику, расположенному в брюшной полости и состоящему из 16 долей.

3. С помощью обычного пинцета вытяните одну долю яичника и наложите у ее основания лигатуру.

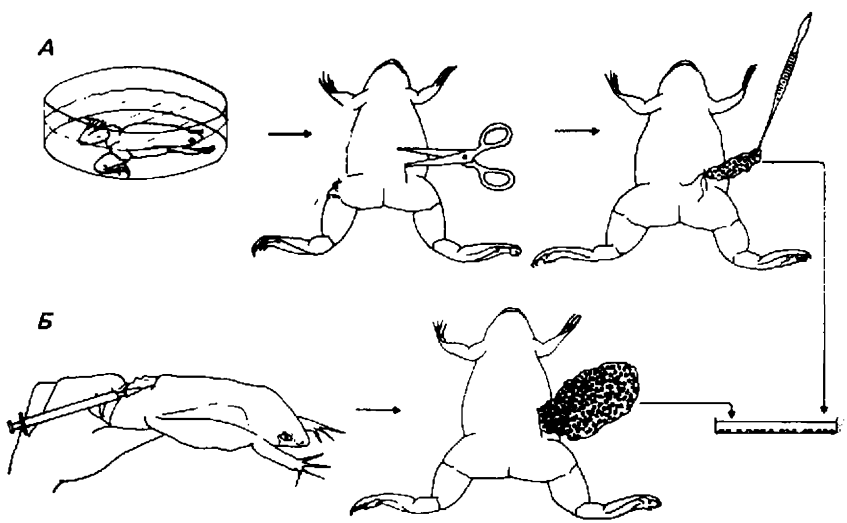


Рис. 1. Извлечение ооцитов из лягушек *Xenopus*. На схемах показано извлечение одной доли яичника через прорезь в стенке брюшной полости наркотизированного животного (*А*), а также инъекция барбитурата для усыпления лягушки и извлечение целого яичника (*Б*). Подробнее эти методы описаны в тексте. (Рисунки выполнены д-ром Дж. Брауном.)

4. Отрежьте долю ножницами и перенесите ее в модифицированный солевой раствор Барта (его состав и приготовление описаны в табл. 5).

5. Наложите швы на стенку брюшной полости и на кожу по отдельности.

6. Оставьте лягушку приходить в нормальное состояние на 24 ч в наклонном резервуаре, частично заполненном водой. В воду добавьте 0,5% NaCl и голову лягушки приподнимите над водой, чтобы она не утонула.

2.2.2. Изъятие целого яичника

1. Наркотизируйте лягушку инъекцией подходящего препарата концентрированного барбитурата (например, препарата Euthetal фирмы May and Baker). Для этого крепко зажмите задние лапки лягушки с помощью полотенца или марли, чтобы она не вырвалась, и инъецируйте 0,3 мл барбитурата на 100 г веса тела подкожно в нижнюю часть спины непосредственно над лапками (рис. 1, *Б*).

2. Поместите лягушку в мелкий сосуд с водой, пока она не заснет.

3. Извлеките весь яичник через разрез, сделанный так, как описано в разд. 2.2.1. Если разрез будет больше, это может привести к повреждению крупных кровеносных сосудов брюшной полости, что затруднит операцию.

2.3. Подготовка ооцитов к инъекции

Чтобы ооциты *Xenopus* сохранили жизнеспособность достаточно долго, совершенно необходимо тщательно промыть их в модифицированном солевом растворе Барта (табл. 3) сразу после извлечения из лягушки. С помощью часового пинцета разделите долю или доли яичника на небольшие кусочки примерно по 10—30 крупных ооцитов. В этих кусочках будут и небольшие незрелые ооциты (рис. 2), но микроинъекцию удобно делать только в крупные ооциты. Храните эти кусочки в чашках Петри при плотности примерно 30 кусочков на 20 мл раствора Барта. Для длительного хранения (несколько дней) поместите их в охлаждаемый инкубатор (например, фирмы Gallenkamp) при 18—21 °С. Более мелкие кусочки (около 10 ооцитов) можно использовать непосредственно для инъекций. Хотя для выделения отдельного ооцита необходимы дополнительные манипуляции, в процессе которых можно внести новые повреждения, это делают довольно часто, так как с изолированным ооцитом работать удобнее, особенно при проведении инъекций в ядро ооцита (гл. 2). Кроме того, в составе кусочков остается

Таблица 5. Состав и приготовление модифицированного солевого раствора Барта

Состав[1]

88,0 мМ NaCl
1,0 мМ KCl
2,4 мМ $NaHCO_3$
15,0 мМ HEPES — NaOH или трис-HCl, pH 7,6
0,30 мМ $CaNO_3 \cdot 4H_2O$
0,41 мМ $CaCl_2 \cdot 6H_2O$
0,82 мМ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
10 мкг/мл натриевой соли пенициллина
10 мкг/мл сульфата стрептомицина

Приготовление[2]

А. Исходный раствор солей

NaCl	128 г
KCl	2 г
$NaHCO_3$	5 г
HEPES	89 г (или трис-основание 45 г)

Растворите реактивы в 1 л дистиллированной воды и доведите pH до 7,6 концентрированной HCl (если используется трис) или 1 М NaOH (если используется HEPES). Доведите объем до 1 л. Храните порциями по 40 мл при —20 °С.

Б. Исходный раствор двухвалентных катионов

$CaNO_3 \cdot 4H_2O$	1,90 г
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	2,25 г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00 г

Растворите реактивы в 1 л дистиллированной воды. Храните порциями по 40 мл при —20 °С.

В. Исходный раствор антибиотиков

Приготовьте свежий раствор натриевой соли пенициллина и сульфата стрептомицина с концентрацией 10 мг/мл каждый.

Для приготовления модифицированного солевого раствора Барта смешайте следующие компоненты в указанном порядке:

919 мл дистиллированной воды
40 мл исходного раствора солей А
40 мл исходного раствора двухвалентных катионов Б
1 мл исходного раствора антибиотиков В

[1] При необходимости вводят следующие добавки: при изучении секреции гентамицина (100 мкг/мл), нистатин (20 ед./мл), а также в некоторых случаях (разд. 4.1) 5% диализованной телячьей или лошадиной сыворотки.

[2] Все реактивы должны быть квалификации не ниже х. ч. (analytical grade).

много мелких ооцитов и других тканей яичника, которые иногда могут осложнять дальнейшие эксперименты. Большое количество изолированных ооцитов можно получить, либо просто отбирая их вручную, либо с помощью ферментативного «раздевания».

2.3.1. Извлечение ооцитов вручную

Если нет необходимости получить несколько тысяч ооцитов, рекомендуется очищать их вручную. Зажмите крупный кусочек яичника (более 30 ооцитов) одним часовым пинцетом и отде-

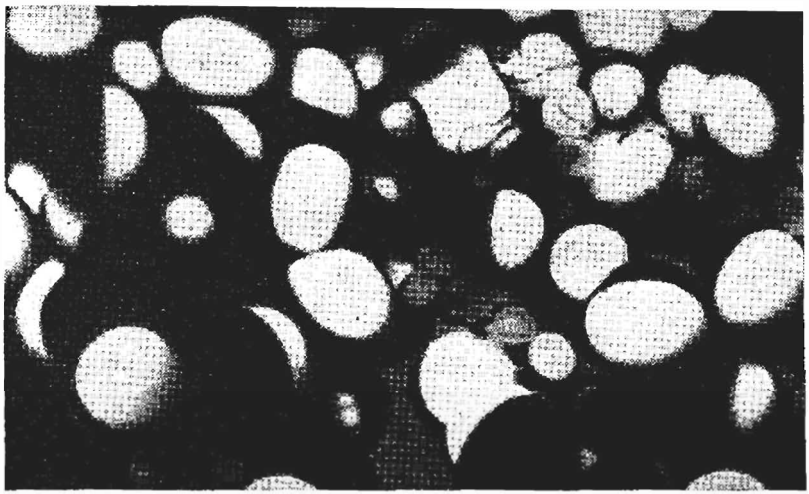


Рис. 2. Участок одной доли яичника показан вскоре после его извлечения из лягушки. Видны ооциты разных размеров на различных стадиях роста.

лите от него ооциты другим пинцетом. Успех этой процедуры зависит от партии ооцитов, причем некоторые ооциты неизбежно повреждаются. Однако изолированные ооциты обычно инкубируют перед инъекцией в течение ночи, после чего поврежденные ооциты выявляются очень легко. Если при этом наблюдаются значительные разрушения, то можно попробовать извлекать отдельные ооциты из кусочков под стереомикроскопом. Манипулировать с выделенными ооцитами удобнее всего с помощью пастеровской пипетки с широким просветом.

2.3.2. Ферментативное «раздевание»

Осторожно перемешайте кусочки яичника с ооцитами 2—4 ч на магнитной мешалке при 18—24 °С в растворе Барта, в который добавлена коллагеназа (Sigma, Type II; концентрация 2 мг/мл). В результате ооциты освобождаются из фолликулов, но еще остаются окруженными тремя слоями соматических клеток.

3. Микроинъекции мРНК в ооциты

3.1. Необходимое оборудование

Для эффективных микроинъекций необходимы стереомикроскоп, микроманипулятор, шприц, источник света и прибор для изготовления микропипеток. Некоторые из этих приборов изображены на рис. 3, *А* и *Б* в рабочем состоянии для микроинъекций.

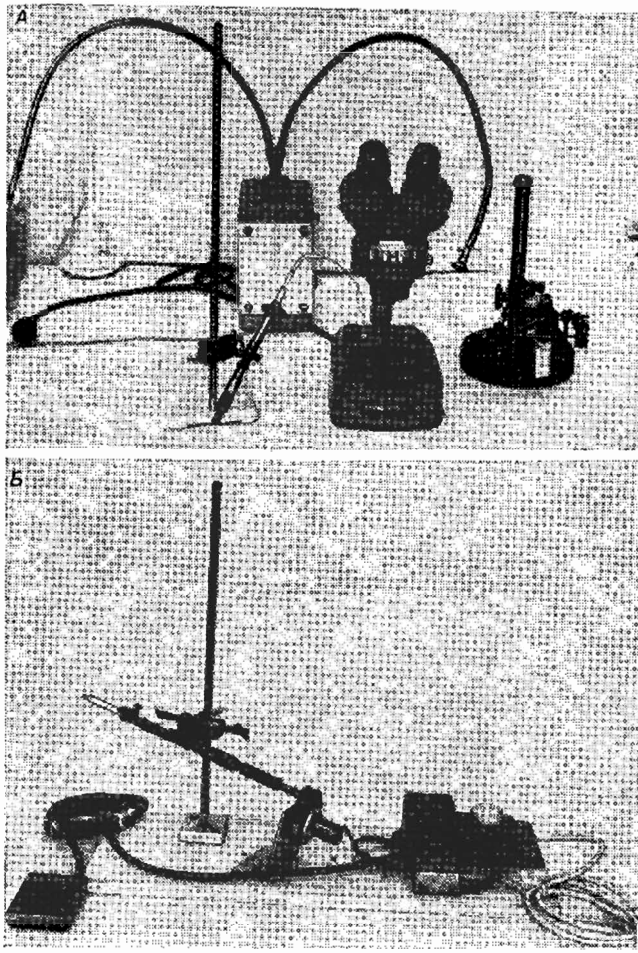


Рис. 3. Оборудование для микроинъекций. *А.* Шприц, микроманипулятор и стереомикроскоп находятся в нормальном рабочем положении. *Б.* Шприц с автоматической подачей. Небольшой шприц с микрометром присоединен к моторчику, который управляется педалью через трансформатор. Трансформатор позволяет изменять скорость вращения микрометрического винта в диапазоне от 0 до 30 об/мин.

3.1.1. Стереомикроскоп

Подходит любой хороший стереомикроскоп, но предпочтителен микроскоп с переменным увеличением и большой глубиной резкости, так как во время микроинъекции желательно, чтобы сам ооцит и мениск жидкости в микропипетке были одновременно в фокусе.

3.1.2. Микроманипулятор

Наиболее удобен микроманипулятор с небольшим понижающим отношением (отношением размаха движений руки и движения самого манипулятора); его можно собрать на базе микроманипулятора Mark 1 фирмы Singer Instrument Company. Он лучше многих более мощных микроманипуляторов и позволяет производить движения в трех измерениях с понижающим отношением 4 : 1. Такие манипуляторы продают фирмы Singer Instrument Company и Oxford Microinstruments.

3.1.3. Шприц

Введение мРНК в ооцит основано на том, что к образцу в микропипетке прикладывается положительное давление, которое передается от шприца через гибкий полиэтиленовый шланг диаметром около 1 мм. Шприц и шланг заполнены медицинским вазелиновым маслом (оно продается в аптеке). Мы используем ручной микрошприц Alga фирмы Wellcome Reagents Ltd., тогда как Бирнстайл и его коллеги [66] предпочитают шприц на 10 мкл фирмы Hamilton, присоединенный к винтовому микродозатору с мотором. Сходная конструкция, но с использованием шприца Alga, изображена на рис. 3, *Б*. Автоматизированная система инъекций дает то преимущество, что при ее использовании одна рука остается свободной, благодаря чему введение раствора в ооциты можно проводить более воспроизводимо и количественно. В любом случае из системы нужно время от времени удалять воздух.

3.1.4. Источник света

Можно использовать любой осветитель для микроскопа. Однако лучше всего подходят лампы с волоконной оптикой (например, лампа с волоконной оптикой Schott фирмы Micro Instruments): они дают интенсивное освещение без нагревания, поэтому ооциты не так сильно подсыхают за время инъекции.

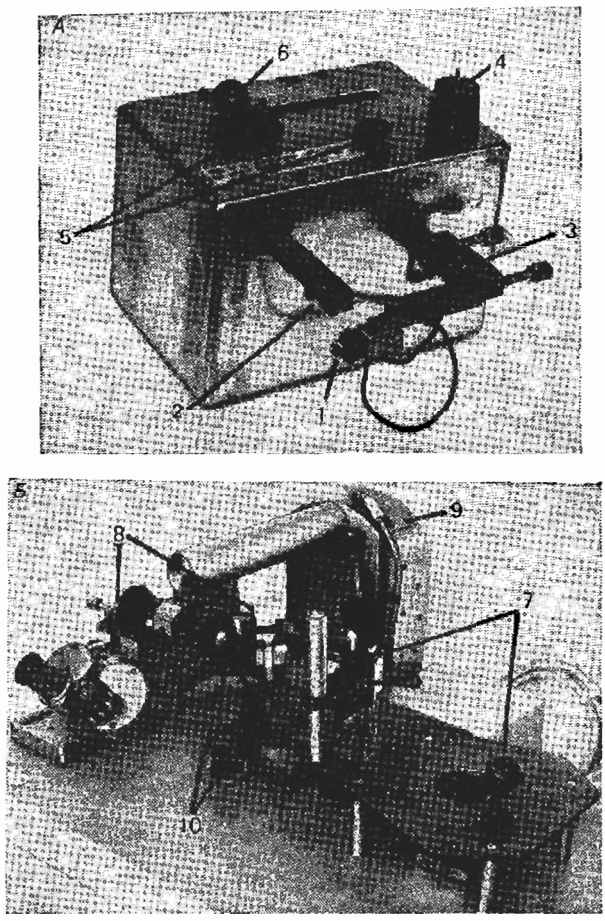


Рис. 4. Прибор для изготовления микропипеток. *А.* Самодельный прибор для вытягивания микропипеток, состоящий из вольфрамовой нагревательной спирали (*1*), зажима для пипеток (*2*), штатива, обеспечивающего перемещение нагревательной спирали в двух направлениях (*3*), груза для пипеток (*4*), запасных нагревательных спиралей (*5*) и реостата-регулятора (*6*). *Б.* Микрокузница. В этом приборе использованы два трехмерных манипулятора, один из них удерживает стеклянную микропипетку (*7*), а другой — платиновую нагревательную спираль (*8*). Эти манипуляторы продает фирма Research Instruments Ltd. Стереомикроскоп (*9*) показан в горизонтальном положении. Реостат (*10*), позволяющий менять сопротивление ступенчато через 1 Ом, входит в состав самодельного источника питания. Микрокузницу, включающую все перечисленные компоненты, можно купить у той же фирмы.

3.1.5. Прибор для изготовления микропипеток

Для изготовления микропипеток нужен надежный прибор для оттягивания кончиков. Он состоит из вольфрамовой нагревательной спирали и стабилизирующего регулируемого источника питания. Можно использовать самодельный прибор (рис. 4, *А*) или имеющийся в продаже надежный прибор для оттягивания микроэлектродов (фирма Searle Bioscience). Микрокузница для заострения кончиков микропипеток при инъекциях мРНК в ооциты не нужна. Однако она необходима, если проводят инъекции в оплодотворенные яйца или ядра ооцитов (гл. 2). Подходящий прибор (рис. 4, *Б*) можно купить у фирмы Research Instruments Ltd.

3.1.6. Вспомогательное оборудование

Ооциты *Xenopus* лучше всего культивировать примерно при 20 °С. При 25 °С синтез белка идет более интенсивно, но ооциты живут не так долго. При температуре выше 30 °С в ооцитах синтезируется только один основной белок теплового шока с мол. массой 72 кДа [67] и инъецированные мРНК не транслируются (A. Colman, неопубликованные данные). Чтобы поддерживать постоянную температуру 20 °С, желательно, хотя и не обязательно, иметь инкубационную камеру с охлаждением или обычный инкубатор в холодной комнате.

3.2. Изготовление, калибровка и хранение микропипеток

По нашему опыту изготовление и калибровка микропипеток — наиболее узкое место при микроинъекциях ооцитов. Внешний диаметр кончика микропипетки не должен превышать 30 мкм. Значительный участок основной трубки с внешним диаметром около 300 мкм должен во время инъекции находиться в поле зрения, чтобы можно было визуально контролировать процесс поочередного введения раствора в несколько ооцитов. К тому же этот основной участок трубки должен иметь ровные, параллельные стенки на протяжении не менее 15 мм, чтобы его было легко откалибровать.

3.2.1. Изготовление

На рис. 5 схематически показаны отдельные этапы изготовления микропипеток. Для этого используют капилляры из твердого стекла (например, фирмы BDH Chemicals Ltd.).

1. Оттяните вручную каждый капилляр в пламени бунзеновской микрогорелки, чтобы внешний диаметр составлял примерно 200 мкм (рис. 5, *А*). Для воспроизводимого и быстрого изготовления микропипеток самое главное — научиться оттягивать вручную такие стандартные капилляры.

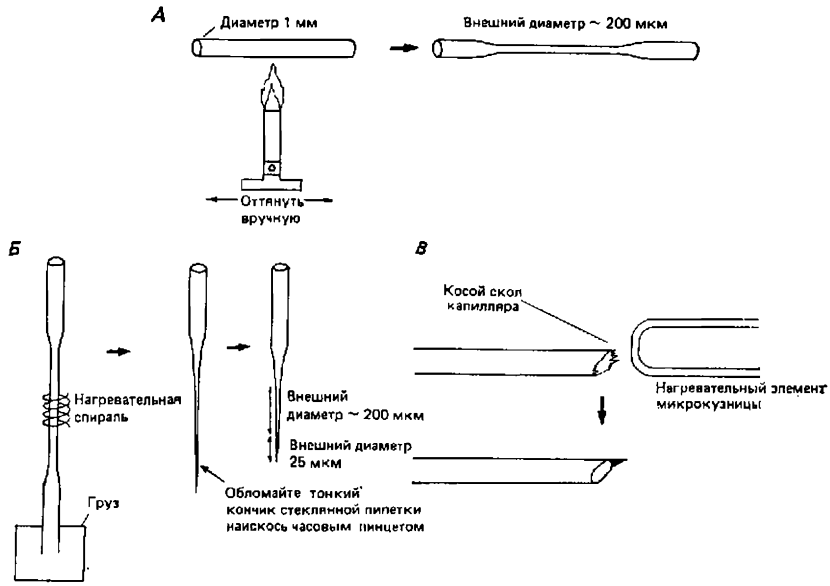


Рис. 5. Изготовление микропипеток. Отдельные этапы изготовления микропипеток показаны схематически и подробно описаны в тексте. Схема взята с некоторыми изменениями из [68].

2. Поместите капилляр в прибор для оттягивания капилляров так, чтобы вольфрамовая спираль окружала часть оттянутого участка (рис. 5, *Б*). Прикрепите подходящий груз к концу капилляра.

3. Подайте напряжение на спираль. Когда стекло разогреется, груз оттянет капилляр вниз и образуется более узкий участок в середине.

4. Сломайте его среднюю часть часовым пинцетом так, чтобы получить микропипетку с косым сколом на конце и с размерами, указанными на рис. 5, *Б*. Окончательный диаметр кончика микропипетки зависит от размера нагревательной спирали, силы тока, величины подвешенного груза и т. д. Эти условия следует подобрать эмпирически.

5. Если нужно, кончик микропипетки можно сделать гладким и острым, на мгновение прикоснувшись им к нагревательному элементу микрокузницы (рис. 5, *В*).

3.2.2. Калибровка

После проникновения микропипетки в ооцит введение образца с помощью гидравлической системы контролируют по положению мениска в просвете микропипетки. Обычно инъецируют

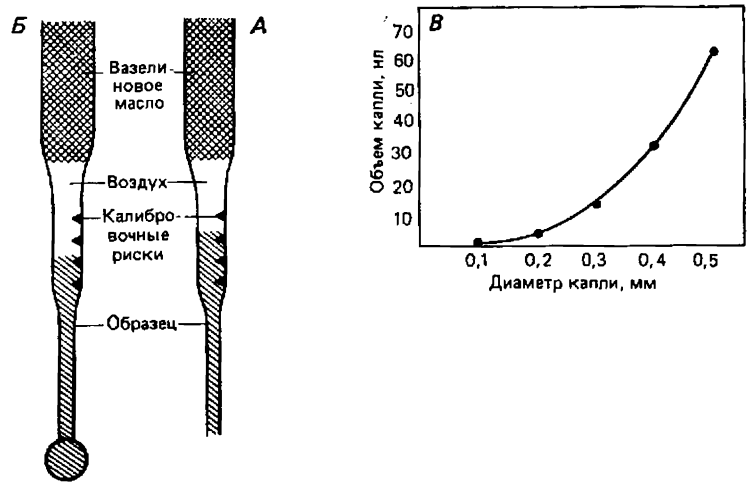


Рис. 6. Калибровка микропипеток. Схематически показаны наполнение микропипетки (*А*) и выпускание капельки жидкости для калибровки (*Б*); подробнее см. в тексте. *В*. На калибровочной кривой отложена зависимость объема ($^4/_3\pi r^3$) от диаметра (2r) сферы, где r — радиус.

50 нл. Ниже описана процедура калибровки пипетки, которая служит исключительно для тренировки. После 2—3 сеансов микроинъекций она быстро становится ненужной: исследователь может вводить 50±20 нл, не нуждаясь в предварительной калибровке и даже нанесении рисок на пипетку.

Калибровка микропипетки включает следующие этапы.

1. Нанесите несколько рисок на равном расстоянии друг от друга подальше от кончика пипетки, как показано на рис. 6, *А*.

2. Наполните пипетку вазелиновым маслом, а затем водой, остановив пузырек воздуха между жидкостями.

3. Медленно выпустите воду, чтобы образовалась круглая капля на кончике пипетки, а мениск передвинулся на расстояние между двумя рисками (рис. 6, *Б*).

4. Измерьте диаметр капли с помощью окулярного микрометра, вычислите ее объем и нанесите результат на рассчитанную калибровочную кривую (рис. 6, *В*).

3.2.3. Хранение микропипеток

Храните микропипетки по одной в вертикальном положении острием вверх в длинных (длиной более 10 см) тонких пробирках. Поместите пробирки вертикально в химический стакан и накройте фольгой. Перед инъекциями мРНК стерилизуйте пробирки нагреванием (не менее 1 ч при 200 °С).

Рис. 7. Зависимость интенсивности синтеза белка от количества мРНК, инъецированной в ооциты *Xenopus*. Данные представляют собой относительное включение [^{3}H]-лейцина в несекретируемый белок — кроличий глобин (крестики) и в группу секретируемых белков — зеинов (кружки) в ооците после инъекции указанного количества мРНК. Включение метки выражено в процентах от максимального включения при инъекции глобиновой мРНК, принятого за 100%. (График построен по опубликованным данным [69].)

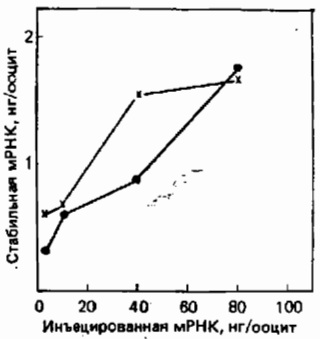


Рис. 8. Деградация мРНК в ооцитах. Стабильность инъецированных глобиновой (крестики) и зеиновой (кружки) мРНК в ооцитах через 10 ч после инъекции анализировали с помощью гибридизации. (График построен по опубликованным данным [69].)

3.3. Микроинъекции матричной РНК

3.3.1. Подбор концентрации мРНК

Растворите мРНК в дистиллированной воде и храните маленькими аликвотами (около 5 мкл) при —70 °С. Лучше использовать очищенную мРНК [например, после хроматографии на oligo (dT)-целлюлозе], а не суммарную клеточную РНК, так как при этом количество белка, синтезированного в расчете на 1 нг инъецированной РНК, будет выше. Вместе с тем присутствие рРНК в образце не мешает трансляции. Как показано на рис. 7, в случае мРНК, кодирующих несекретируемые белки, количество синтезированного белка растет с увеличением количества инъецированной мРНК по крайней мере до 100 нг на ооцит (т. е. до введения 50 нл с концентрацией 2 мг/мл). Однако при высокой концентрации инъецированной мРНК происходит ее значительная деградация (рис. 8), поэтому синтез белка увеличивается нелинейно: удвоение количества мРНК не дает пропорционального увеличения синтеза белка. Если инъецируют мРНК, кодирующие секретируемые белки, то при высокой концентрации они также деградируют, причем насыщение аппарата трансляции достигается уже при инъекции 20 нг мРНК

(рис. 7). Из всех этих данных можно сделать вывод [69], что лучше всего инъецировать до 10 нг мРНК в один ооцит при концентрации мРНК 0,2 мг/мл, за исключением тех случаев, когда белок трудно выявить.

3.3.2. Заполнение микропипеток раствором матричной РНК

Перенесите небольшой объем раствора мРНК (1—2 мкл) на кусочек парафильма или нескофильма и наполните пипетку, всасывая мРНК до того момента, пока мениск не дойдет до края поля зрения. Хотя это можно сделать, сохраняя пузырек воздуха между раствором и вазелиновым маслом (рис. 6), легче контролировать процесс, если вся микропипетка до забора пробы была заполнена маслом. Вазелиновое масло не оказывает никакого действия на мРНК, но граница масла и водного раствора плохо видна. Чтобы лучше ее видеть, можно ввести в вазелиновое масло жирорастворимый краситель быстрый красный. После заполнения микропипетки храните неиспользованный раствор мРНК на подложке на льду.

3.3.3. Микроинъекция

1. Перенесите 4—5 ооцитов (или 9—10, если вы достаточно опытны) на чистое предметное стекло с помощью пастеровской пипетки большого диаметра.

2. Отсосите избыток жидкости и поместите стекло на столик стереомикроскопа.

3. Способы иммобилизации ооцитов во время инъекции могут быть различными. Либо осторожно держите ооцит часовым пинцетом, либо расположите ооциты вдоль края второго предметного стекла, положенного поверх первого.

4. Введите 50 нл (±20 нл) РНК в вегетативную (желтую) область ооцита (рис. 9, *А*); при инъекции в анимальную (пигментированную) область старайтесь не повредить ядро ооцита, чтобы процент гибели ооцитов[1)] был не слишком высоким. Не давайте ооцитам подсыхать во время инъекции.

5. После инъекции перенесите ооциты обратно в солевой раствор Барта.

Позднее возможны повторные инъекции мРНК в те же ооциты [69, 70]. Имея опыт, можно инъецировать 200—300 ооцитов в час.

[1)] Равномерное распределение мРНК по ооциту происходит гораздо быстрее, если производить инъекцию в вегетативную или экваториальную область, а не в анимальную (Colman, Drummond, неопубликованные наблюдения).

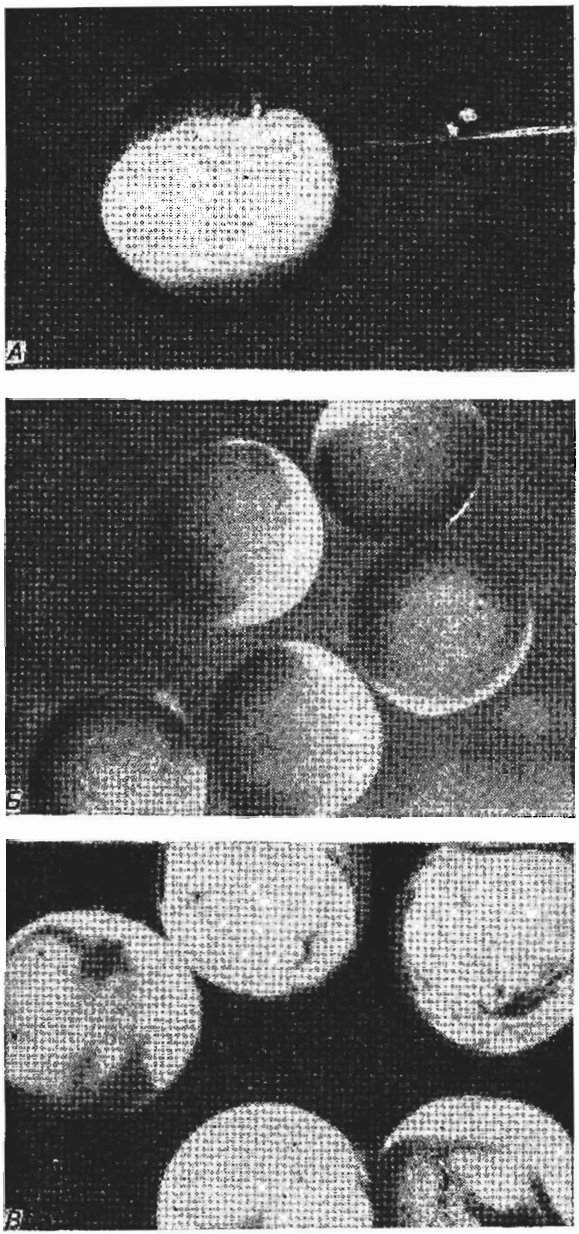


Рис. 9. *А*. Ооцит во время микроинъекции. *Б*. Нормальные ооциты. *В*. Неполноценные ооциты. Обратите внимание на неравномерную пигментацию последних по сравнению с более или менее равномерно окрашенными нормальными ооцитами.

4. Культивирование ооцитов после инъекции и введение в них радиоактивной метки

4.1. Среда для культивирования

Чаще всего для культивирования ооцитов используют модифицированную солевую среду Барта, содержащую в качестве буфера трис или HEPES (табл. 5). При физиологических значениях pH HEPES имеет лучшую буферную емкость, но это не так важно, потому что ооциты выдерживают значительные колебания pH (pH 7,5±0,4). В солевой раствор следует добавить пенициллин и стрептомицин, а при исследованиях секреции белка рекомендуется вводить также гентамицин и фунгицид нистатин. Кроме того, добавление в среду сыворотки плода коровы до концентрации 5% или лошадиной сыворотки (в обоих случаях диализованной против солевого раствора Барта) предотвращает восстановление сульфгидрильных связей в продуктах секреции [49]. При этом подавляется также протеолитическое расщепление секретируемых белков протеазами, которые выделяются клетками фолликулярного слоя, окружающими ооциты [71]. Сыворотку необходимо добавлять в среду только в случае секретируемых белков.

4.2. Выбор радиоактивных аминокислот

Поскольку ооциты проницаемы для аминокислот, белки ооцита включают радиоактивные аминокислоты, если их просто добавить в среду. Однако поглощение экзогенных радиоактивных аминокислот из среды и их уравновешивание с внутренним пулом занимают 30—60 мин. Поэтому при необходимости кратковременного импульсного введения метки в белок следует инъецировать концентрированный раствор меченой аминокислоты [72]. Даже после этого диффузия внутри ооцита занимает некоторое время. Если при этом вводят аминокислоту, эндогенный пул которой невелик, радиоактивная аминокислота может быть израсходована еще до того, как ее концентрация уравновесится по всему ооциту.

Выбор меченой аминокислоты зависит от потребностей данного эксперимента. Чаще всего используют [^{35}S]-метионин, так как он сравнительно недорог, имеет высокую удельную активность и для ^{35}S характерно β-излучение с высокой энергией (по сравнению с тритием). Эффективность избранной аминокислоты для мечения новосинтезированных белков ооцита сильно зависит от размера аминокислотного пула. В табл. 6 приведены размеры пулов различных аминокислот в ооците *Xenopus*. Пулы гистидина, пролина, лейцина и метионина сравнительно неве-

Таблица 6. Пулы аминокислот в крупных ооцитах *Xenopus*[1]

Аминокислота	пмоль/ооцит	
	партия 1	партия 2
Лизин	182	158
Гистидин	67	84
Аргинин	96	95
Аспарагиновая кислота	265	470
Треонин	283	240
Серин	374	495
Глутаминовая кислота	857	741
Пролин[2]	67	78
Глицин	194	261
Аланин	273	153
Цистеин	36	—
Валин	84	125
Метионин[2]	29	31
Изолейцин	37	56
Лейцин[2]	45	84
Тирозин	73	32
Фенилаланин	54	45

[1] Таблица составлена по неопубликованным данным, любезно предоставленным д-рами Вудлэндом и Адамсоном.
[2] Судя по эффективности мечения белков в присутствии меченых метионина, лейцина и пролина, полный пул каждой из этих аминокислот, по-видимому, доступен для синтеза белка.

лики, поэтому часто используют именно эти радиоактивные аминокислоты. Однако в определенных условиях использование меченых аминокислот, пул которых в ооците достаточно велик, может давать преимущества. Например, для мечения гистонов используют [^{3}H]-лизин [73], так как он преобладает в этих белках.

Ооциты выдерживают очень высокие концентрации радиоактивной аминокислоты, и обычно в инкубационную среду добавляют 0,1—5 мКи/мл. Если инкубировать 5 ооцитов в 30 мкл среды, содержащей 1 мКи/мл [^{35}S]-метионина с удельной активностью 350 Ки/ммоль, в течение 10 ч, то включение в белок в одном ооците достигает $2 \cdot 10^6$ расп./мин. Если даже считать, что лишь 10% новосинтезированного белка кодируется инъецированной мРНК, то очевидно, что для анализа потребуется весьма небольшая часть всего материала. Следует, правда, отметить, что при небольшом пуле аминокислоты и ее высокой удельной активности новосинтезированные белки обладают высокой, но постоянно изменяющейся удельной активностью. Поэтому, если нужны количественные данные, эксперименты следует планировать с большой тщательностью. Например, чтобы получить линейную зависимость включения [^{35}S]-метионина в белок от времени в течение 24 ч (в приведенных выше услови-

ях), удельную активность аминокислоты следует понизить до 50 Ки/ммоль, добавив в среду немеченый метионин до конечной концентрации 0,06 мМ.

Если в эксперименте требуется провести разведение нерадиоактивной средой, то по нашему опыту при временах инкубации, не превышающих 1 ч, вполне достаточно ввести немеченую аминокислоту в концентрации 10 мМ (в случае метионина). При высокой удельной активности [^{35}S]-метионина (более 350 Ки/ммоль) при инкубации дольше 6 ч разведение метки происходит и без вмешательства экспериментатора. Поэтому если существует возможность синтеза какого-либо нестабильного белкового продукта, то проводить более длительную инкубацию не рекомендуется.

4.3. Другие радиоактивные предшественники

В некоторых экспериментах используют другие радиоактивные предшественники помимо меченых аминокислот.

[^{3}H]-*ацетат* добавляют в среду в концентрации 10—100 мКи/мл для доказательства посттрансляционного ацетилирования белков. Правда, некоторая часть [^{3}H]-ацетата превращается в ходе метаболических процессов в [^{3}H]-аминокислоты [72], поэтому новосинтезированные белки, как правило, также метятся.

[^{32}P]-*фосфат* используют в концентрации 10—20 мКи/мл для доказательства фосфорилирования белков. Однако даже при такой концентрации изотопа включение очень низкое [73], так как в ооците имеется большой пул неорганического фосфата.

[^{3}H]- *или* [^{14}C]-*маннозa.* [^{14}C]-маннозу в концентрации 10 мкКи/мл [47] или [^{3}H]-маннозу [45] в концентрации 1 мКи/мл добавляют в среду для доказательства гликозилирования.

4.4. Выбор времени мечения

Прежде чем трансляция мРНК, инъецированных в ооциты, достигнет максимального уровня, может пройти несколько часов [61]. Для решения многих задач этот период «вовлечения» мРНК в трансляцию можно не принимать во внимание и начинать инкубацию вскоре после инъекции. Именно таким образом следует проводить эксперименты при использовании для инъекций poly(A)$^-$-мРНК, так как некоторые из них [33], хотя и не все [27], нестабильны в ооцитах. Poly(A)$^+$-мРНК, наоборот, весьма стабильны в ооцитах [9] (с известными оговорками — см. разд. 3.3.1). При исследовании секреции перед мечением ооциты после инъекции следует оставлять на ночь. При этом выявляются неполноценные ооциты, которые удаляют перед

мечением (рис. 9, *В*), что позволяет более экономно расходовать меченый предшественник и свести к минимуму неспецифическую утечку белков ооцитов в культуральную среду. Такая утечка может осложнить последующий анализ и обеспечить питательный субстрат для роста в среде микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам.

4.5. Процедура мечения ооцитов

Как описано в разд. 4.2, ооциты можно пометить, инкубируя их в среде в присутствии радиоактивного предшественника или вводя в них изотоп. Здесь мы рассмотрим первый метод; инъекцию изотопа проводят, как описано ранее в этой главе для мРНК (разд. 3.3).

Пометьте ооциты в ячейках панелей для микротитрования одноразового пользования. Инкубируйте ооциты по пять штук в ячейке в 30 мкл среды, проследив, чтобы все ооциты были погружены в среду. При изучении секреции покройте предварительно поверхность ячейки слоем белка. Для этого внесите в них раствор бычьего сывороточного альбумина (0,5 мг/мл в солевом растворе) на 20 мин при 37 °С и промойте солевым раствором.

Если пробы ставят с целью последующего определения синтезированного белка, можно использовать бóльшие объемы инкубационной среды. Для этого идеально подходят пластиковые прокладки в крышках для сцинтилляционных кювет (годятся прокладки практически любой формы). В каждой из них можно инкубировать примерно 25 ооцитов в 300 мкл среды.

5. Сбор, фракционирование и анализ ооцитов и инкубационной среды после культивирования

Как отмечено во введении, в ооцитах *Xenopus* происходит не только трансляция и модификация чужеродных белков, но и их перенос в соответствующее место в клетке, а также экспорт секретируемых белков. Выбор способа фракционирования зависит от цели эксперимента. Если гомогенизируют ооциты в присутствии детергентов, то солюбилизируются все связанные с мембранами белки, тогда как гомогенизация в отсутствие детергента и последующее фракционирование в градиенте сахарозы позволяют получить предварительные данные о внутриклеточной локализации того или иного белка. В некоторых случаях, например при синтезе интерферонов млекопитающих, экспорт белка происходит так быстро, что для оценки синтеза белка достаточно проанализировать только инкубационную среду [62].

Кроме того, выбор метода анализа зависит от особенностей того или иного исследуемого белка, а также от того, что в отличие от некоторых бесклеточных систем в ооците имеется высокий уровень эндогенной трансляции. Во многих случаях, особенно если концентрация специфической мРНК низка, необходимо прибегать к таким методам анализа, как иммунопреципитация, двумерный гель-электрофорез, избирательная экстракция или подходящий биологический тест. Ниже будут описаны лишь наиболее распространенные методы фракционирования и анализа.

5.1. Разделение ооцитов и инкубационной среды после инкубации

По окончании инкубации внимательно осмотрите ячейки панели для микротитрования. Отберите среду только из тех ячеек, где нет неполноценных ооцитов (рис. 9). Извлеките ооциты и промойте их модифицированной солевой средой Барта. Если ооциты необходимо в дальнейшем фракционировать, их нельзя замораживать, так как процессы замораживания и оттаивания влияют на внутриклеточную компартментацию белков. Если содержимое ооцитов предполагается анализировать без фракционирования, их можно быстро заморозить в сухом льду и затем хранить при —20 °С.

5.2. Гомогенизация ооцитов

Если фракционировать ооциты не требуется, проведите следующие операции.

1. Гомогенизируйте свежие или замороженные ооциты в буфере для гомогенизации (табл. 7), добавляя 20—50 мкл буфера на ооцит.
2. Отцентрифугируйте в микроцентрифуге при 10 000 *g*.
3. Отберите супернатант, стараясь по возможности не захватить липидную пленку. Этот супернатант можно использовать непосредственно для электрофореза, добавив буфер для нанесения пробы (табл. 7), или провести сначала с ним иммунопреципитацию (разд. 5.4).

5.3. Фракционирование ооцитов с помощью центрифугирования в градиенте сахарозы

Мембранные и секретируемые белки можно отделить от белков ядра и цитозоля с помощью ступенчатых градиентов сахарозы. Следует использовать свежевыделенные, незамороженные ооциты (разд. 5.1). В результате этой процедуры более 90% секретируемых белков оказывается во фракции мембранных эле-

Таблица 7. Растворы для гомогенизации и фракционирования ооцитов и для иммунопреципитации и электрофореза белковых продуктов

Буфер для гомогенизации
0,1 М NaCl
1%-ный тритон X-100
1 мМ PMSF[1]
20 мМ трис-HCl, pH 7,6

Т-буфер
50 мМ NaCl
10 мМ ацетат магния
1 мМ PMSF[1] (если предстоит обработка протеазой, то этот компонент исключите)
20 мМ трис-HCl, pH 7,6

Буфер для иммунопреципитации
0,1 М KCl
5 мМ $MgCl_2$
1%-ный тритон X-100
0,5%-ный ДСН
1% дезоксихолата натрия
1 мМ PMSF[1]
0,1 М трис-HCl, pH 8,2
Чтобы приготовить этот буфер, смешайте компоненты в следующем порядке:

1 М трис-HCl, pH 7,6	5,0 мл
1 М KCl	5,0 мл
0,5 М $MgCl_2$	0,5 мл
100%-ный тритон X-100	0,5 мл
10%-ный ДСН	2,5 мл
10%-ный раствор дезоксихолата натрия в воде (свежеприготовленный)	5 мл
100 мМ PMSF[1]	0,5 мл

Оттитруйте буфер NaOH до pH 8,2 и доведите объем до 50 мл

Буфер для нанесения проб на гель для проведения электрофореза
1 М сахароза
0,1%-ный бромфеноловый синий
5 мМ ЭДТА
2%-ный ДСН
0,2 М трис-HCl, pH 8,8

[1] 0,1 М исходный раствор PMSF в этаноле храните при —20 °С и добавляйте в буфер непосредственно перед его использованием.

ментов, представляющих собой фрагменты эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи и плазматических мембран ооцита. Эта фракция мембранных элементов до некоторой степени загрязнена ядерными мембранами (хотя в ней нет примесей содержимого ядер). Подобного загрязнения можно избежать, если предварительно удалить из ооцитов ядра (разд. 6.1). Ниже описано два метода фракционирования в градиенте сахарозы (они представляют собой модификацию опубликованных методов [56]). При постановке опытов важно работать быстро и использовать охлажденные растворы.

5.3.1. «Ступенчатый» метод

1. Гомогенизируйте примерно 20 ооцитов в 0,5 мл 10%-ного (вес/объем) раствора сахарозы в Т-буфере (табл. 7) с добавлением NaCl до конечной концентрации 0,15 М.

2. Наслоите гомогенат на ступенчатый градиент, состоящий из 1 мл 20%-ной (вес/объем) сахарозы, наслоенной на 1 мл 50%-ной (вес/объем) сахарозы (оба раствора на Т-буфере). Отцентрифугируйте 30 мин при 15 000 *g* в бакет-роторе.

3. После центрифугирования на поверхности градиента образуется липидная пленка. Слой 10%-ной сахарозы содержит компоненты цитозоля, а на границе между 10%-ной и 20%-ной сахарозой находятся главным образом митохондрии. На границе между 20%-ной и 50%-ной сахарозой обнаруживаются мембранные элементы, и именно здесь должны быть все мембранные и секретируемые белки. Тяжелые желтковые гранулы образуют осадок на дне. Отберите нужную фракцию пастеровской пипеткой. Эта процедура позволяет сохранить целостность мембран, если с ними необходимо проводить дальнейшие манипуляции, например опыты по защите от протеазы (разд. 6.4).

5.3.2. Метод «подушки»

Для многих целей более целесообразно осадить мембраны на дно. В этом случае действуйте, как описано в предыдущем разделе, но не подслаивайте 50%-ную сахарозу. В данных условиях мембраны оседают на дно вместе с желтком. Ресуспендируйте осадок в буфере для гомогенизации, чтобы солюбилизировать мембраны и секретируемые белки, и белки желтка осадите центрифугированием в течение 1 мин в микроцентрифуге.

5.4. Обработка инкубационной среды

Если необходимо проверить присутствие секретируемых белков в среде инкубации с помощью иммунопреципитации и последующего гель-электрофореза (см. ниже), сначала осветлите среду центрифугированием в микроцентрифуге в течение 5 мин. Это позволяет удалить все загрязняющие среду бактерии; в противном случае они соосаждаются при иммунопреципитации.

5.5. Иммунопреципитация

1. К аликвоте пробы объемом 100 мкл (будь то гомогенат, фракция сахарозного градиента или осветленная культуральная среда) добавьте 400 мкл буфера для иммунопреципитации (табл. 7) и оставьте на 30 мин при 4 °С.

2. Добавьте антитела и оставьте еще на 30 мин при 4 °С.

3. Добавьте 20 мкл 10%-ной (по объему) суспензии оболочек *Staphylococcus aureus*, обработанных формальдегидом (Pharmacia), и встряхивайте на качалке не менее чем 2 ч при 4 °С.

4. Осадите фракцию оболочек в микроцентрифуге (20 с) и затем трижды промойте свежим буфером для иммунопреципитации.

5. Ресуспендируйте промытый осадок в 30 мкл буфера для электрофореза (табл. 7). Добавьте 1 мкл 0,1 М ДТТ (исходный раствор ДТТ храните при —20 °С), перемешайте и прокипятите в течение 3 мин.

5.6. Алкилирование и анализ белков с помощью электрофореза в ПААГ — ДСН в восстанавливающих условиях

Алкилирование — очень простая процедура, и ее рекомендуется проводить, чтобы избежать образования внутрицепочечных S—S-связей, которые могут возникать во время электрофореза и давать аномалии в картине электрофореза.

1. К 30 мкл пробы, растворенной в буфере для электрофореза (табл. 7), добавьте 5 мкл 0,5 М иодацетамида (натриевая соль; раствор храните в аликвотах при —70 °С). Оставьте на 20 мин при комнатной температуре.

2. Отцентрифугируйте 5 мин в микроцентрифуге, чтобы осадить весь бактериальный дебрис.

3. Нанесите пробу (супернатант) на пластинку ПААГ—ДСН, приготовленную для электрофореза в восстанавливающих условиях [74].

Результаты эксперимента с использованием методик, описанных в разд. 5.3—5.6, показаны на рис. 10.

5.7. Частичное алкилирование и анализ в ПААГ — ДСН без восстановления

Иногда, например при изучении тетрамерного иммуноглобулина [49], целесообразно алкилировать белки ооцита непосредственно во время гомогенизации, чтобы исследовать мультимерные белки в условиях, препятствующих их образованию из мономеров. Ниже приведена соответствующая методика.

1. Гомогенизируйте ооциты в буфере для гомогенизации, содержащем 0,1 М иодацетамид (добавленный непосредственно перед опытом). Оставьте на 20 мин при комнатной температуре.

2. Осадите белки 5 объемами холодного ацетона и оставьте во льду на 10 мин.

3. Отцентрифугируйте 5 мин в микроцентрифуге и высушите осадок на воздухе.

4. Осадок ресуспендируйте в буфере для иммунопреципитации или для электрофореза и обработайте, как описано в

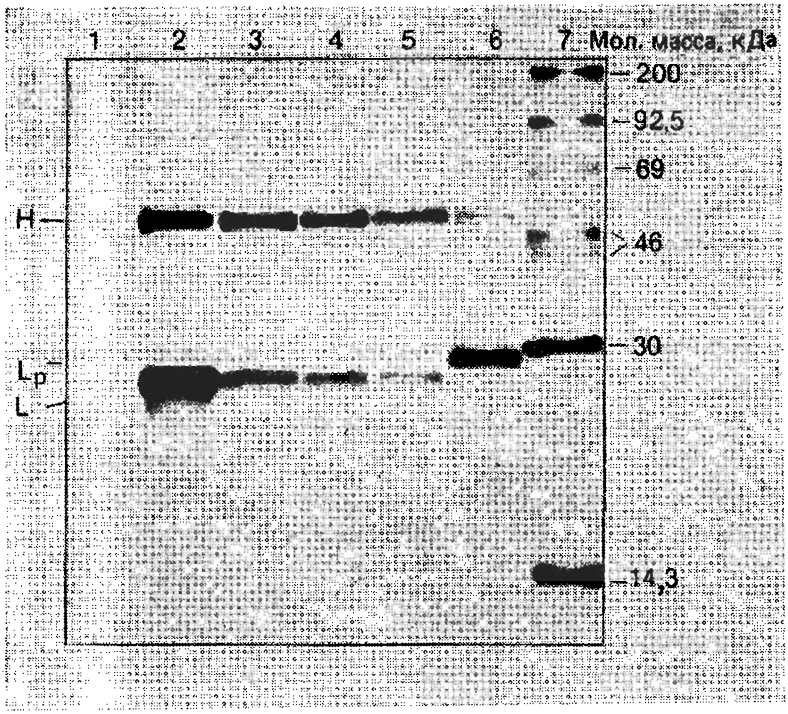


Рис. 10. Фракционирование ооцитов после микроинъекций. В ооциты вводили мРНК, кодирующие легкие (L) и тяжелые (H) цепи иммуноглобулинов и метили белки [^{35}S]-метионином в течение 24 ч. Меченые ооциты фракционировали методом центрифугирования в ступенчатом градиенте сахарозы (разд. 5.3.1) и затем проводили иммунопреципитацию и электрофорез в 12,5%-ном ПААГ в восстанавливающих условиях. Дорожки 1, 2 и 3 — иммунопреципитаты препаратов цитозоля, мембран и инкубационной среды соответственно. Дорожки 4 и 5 — иммунопреципитаты меченых клеток родительской миеломы и их инкубационной среды соответственно. На дорожке 6 показаны продукты трансляции иммуноглобулиновой мРНК в бесклеточной системе трансляции из зародышей пшеницы. Виден предшественник легкой цепи (L_p). На дорожку 7 нанесены [^{14}C]-маркерные белки. (Воспроизводится с разрешения авторов [49].)

разд. 5.4 и 5.5 соответственно; для электрофореза в ПААГ—ДСН ДТТ не добавляйте, так как он проводится в невосстанавливающих условиях.

5.8. Двумерный гель-электрофорез

Ниже приведена методика двумерного гель-электрофореза.

1. Смешайте 20 мкл гомогената, препарата мембран, цитозоля или осветленной среды инкубации (если исследуемый бе-

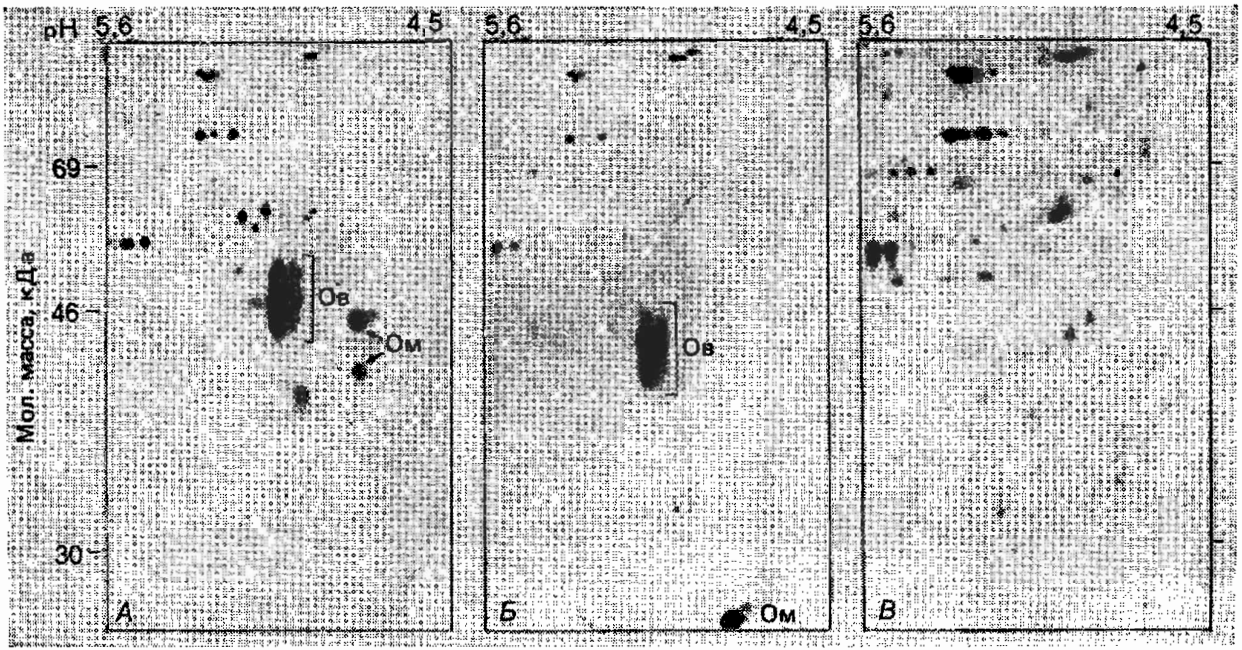


Рис. 11. Действие туникамицина на ооциты. В ооциты инъецировали мРНК яйцеводов кур (1 мг/мл) вместе с туникамицином (40 мкг/мл) или без него и инкубировали 24 ч в присутствии [^{35}S]-метионина в присутствии туникамицина (2 мкг/мл) или без него. Мембранную фракцию ооцитов после микроинъекции (без туникамицина (*А*), с туникамицином (*Б*) и без микроинъекции (*В*) анализировали двумерным электрофорезом и последующей флюорографией. Обозначения: Ов — полипептиды куриного овальбумина; Ом — куриный овомукоид. (Воспроизводится с разрешения авторов [39].)

лок секретируется) с 0,5 мл лизирующего буфера, содержащего 9,5 М мочевину (квалификации ос. ч. ultrapure), 2%-ный (по объему) детергент нонидет Р-40, 20%-ные (по объему) амфолины (смесь одного объема амфолинов для диапазона pH 3,5—10 и двух объемов для pH 5—7), 5%-ный 2-меркаптоэтанол и 0,1%-ный ДСН. Если перед электрофорезом необходимо сконцентрировать фракции, то, прежде чем растворить образец в указанном лизирующем буфере, лиофилизируйте его. Иммунопреципитаты можно растворять прямо в лизирующем буфере.

2. Отцентрифугируйте препарат в микроцентрифуге 10 мин.

3. Отберите прозрачный супернатант, проткнув пробирку сбоку иглой, чтобы не захватить плавающую на поверхности пленку липидов.

4. Этот супернатант без какой-либо дополнительной обработки нанесите на гели для разделения изоэлектрофокусированием.

На рис. 11 представлен пример двумерного разделения такого препарата.

6. Специальные методы

6.1. Энуклеация ооцитов

Ооциты лягушек относятся к числу редких клеток, у которых можно вручную удалить ядро. Энуклеация часто оказывается необходимой в таких экспериментах, когда вклад собственного аппарата транскрипции ооцита может усложнить интерпретацию данных. Кроме того, энуклеация представляет собой весьма эффективный метод фракционирования ооцита в тех случаях, когда предполагают, что белок, кодируемый инъецированной мРНК, переносится в ядро. Описанные ниже методы занимают немного времени и позволяют собрать ядра и энуклеированные ооциты для дальнейшего анализа. Они не подходят, если планируются инъекции в безъядерные ооциты; в этих случаях используют методы Форда и Гердона [75].

6.1.1. Метод 1

1. Осторожно придержите ооцит часовым пинцетом в модифицированном солевом растворе Барта так, чтобы пигментированная половина находилась вверху.

2. Сделайте надрез в верхней точке пигментированной половины кончиком иглы № 23. Проследите, чтобы надрез был неглубоким.

3. Осторожно сожмите ооцит в его средней части. Сферическое прозрачное ядро диаметром около 0,3 мм выдавится нару-

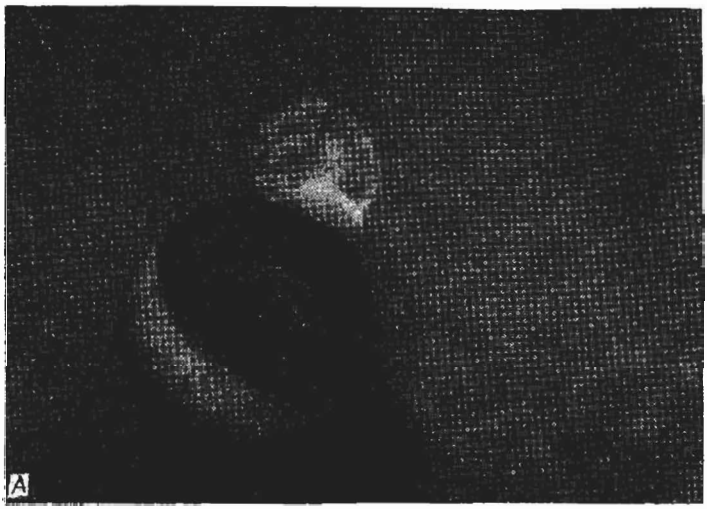


Рис. 12. Энуклеация ооцитов. Показаны этапы энуклеации методом 1 (разд. 6.1.1). На верхушке пигментированной половины ооцита делают поверхностный надрез с помощью иглы № 23. После этого осторожно сжимают ооцит в экваториальной области; ядро постепенно выдавливается наружу (*А*) и в конце концов полностью высвобождается (*Б*).

жу (рис. 12). Нуклеоплазма имеет вид геля, и если энуклеацию проводят слишком грубо, видно, как желеобразная масса выходит из ядерной оболочки. Не используйте такие поврежденные ядра.

4. Извлеченное ядро освободите от приставшего к нему цитоплазматического материала. Для этого его несколько раз всосите в кончик микропипетки с широким отверстием и выпустите обратно, прежде чем перенести в пробирку, стоящую во льду. При известном навыке очищенное ядро можно получить через 30 с после прокалывания ооцита. Энуклеированный ооцит используйте в дальнейших экспериментах, как описано в разд. 5 для интактных ооцитов.

6.1.2. Метод 2

1. Поместите ооцит в холодную 5—20%-ную ТХУ на 15 мин.
2. Вскройте каждый ооцит часовым пинцетом и извлеките фиксированное кислотой ядро.
3. Объедините требуемое число ядер и осадите их в микроцентрифуге в течение 30 с.
4. Отбросьте супернатант и отмойте ядра от оставшейся кислоты с помощью двух промывок ядерного осадка холодным ацетоном.
5. Белки осажденных ядер можно растворить прямо в буфере для нанесения (табл. 7) и анализировать с помощью электрофореза в ПААГ—ДСН.

6.2. Ингибирование трансляции

Циклогексимид, добавленный в среду инкубации в концентрации 100 мкг/мл, эффективно блокирует трансляцию. В присутствии этого соединения ооциты живут не более 36 ч [62].

6.3. Ингибирование посттрансляционной модификации

Исходный раствор туникамицина в концентрации 1 мг/мл готовят в диметилсульфоксиде и хранят при —20 °С. Лучше всего вводить препарат в концентрации 40 мкг/мл во время микроинъекции вместе с мРНК [39]. Кроме того, туникамицин вводят в инкубационную среду (2 мкг/мл). Прежде чем метить ооциты радиоактивным предшественником, проинкубируйте их 24 ч с антибиотиком. Если добавлять туникамицин только в инкубационную среду даже в концентрации 20 мкг/мл, его эффективность недостаточна. Рис. 11 иллюстрирует использование туникамицина.

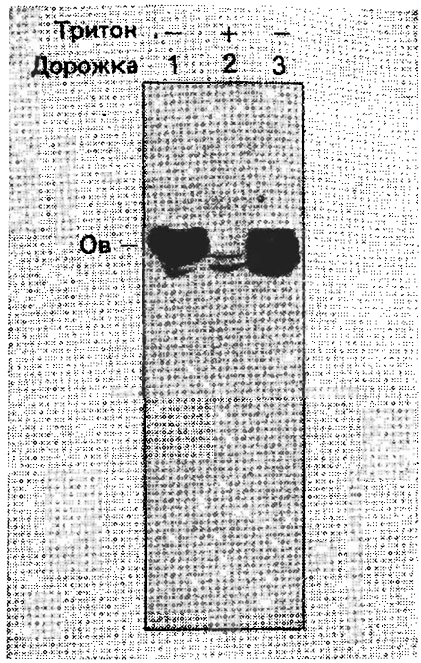


Рис. 13. Эксперимент по защите от протеазы. мРНК из яйцеводов кур инъецировали в ооциты и метили белки в среде, содержащей [^{35}S]-метионин. Фракцию мембраны выделяли из гомогенизированных ооцитов методом центрифугирования на сахарозную подушку (разд. 5.3.2) и обрабатывали протеиназой К в присутствии или в отсутствие тритона X-100, как указано в разд. 6.4. Обработанные образцы анализировали с помощью иммунопреципитации антителами против овальбумина и электрофореза в 12,5%-ном ПААГ (разд. 5.4 и 5.5). Дорожка 1 — мембраны инкубировали при 0 °С в отсутствие протеиназы К. Дорожки 2 и 3 — мембраны инкубировали в присутствии протеиназы К 90 мин при 20 °С. Обозначения: Ов — овальбумин.

6.4. Эксперименты по защите от протеаз

Часто оказывается необходимым определить расположение белков относительно мембран, с которыми они соосаждаются при центрифугировании. При фракционировании ткани белки часто беспорядочно налипают на мембранный дебрис. Однако такие белки доступны для экзогенных протеаз, поэтому устойчивость белков к протеолизу в отсутствие детергента с большой вероятностью указывает на то, что белки встроены в мембраны. Ниже приведена методика, которая с успехом используется на ооцитах (пример эксперимента, поставленного по этой методике, показан на рис. 13).

1. Получите препарат мембран ооцита с помощью центрифугирования в ступенчатом градиенте сахарозы (разд. 5.3.1).

2. Разведите препарат мембран 3 объемами Т-буфера (табл. 7) и разделите его на 3 пробы.

3. В первую пробу добавьте протеиназу К (Calbiochem) до конечной концентрации 100 мкг/мл. Во вторую пробу добавьте протеиназу К (100 мкг/мл) и тритон X-100 (1%, по объему). Третья проба представляет собой контроль, и в нее ничего не добавляйте.

4. Проинкубируйте все пробы 90 мин при 20 °С.

5. Добавьте в конце инкубации PMSF до конечной концентрации 1 мМ и проанализируйте белковые продукты, как описано в разд. 5.4—5.7.

7. Использование системы ооцитов

Синтез белков в ооцитах *Xenopus* можно программировать с помощью эукариотических мРНК, выделенных из самых разнообразных организмов, от растений до млекопитающих. В большинстве случаев эти мРНК эффективно транслируются, если их качество соответствует требованиям, указанным в разд. 3.3.1. Однако, по всей вероятности, в ооцитах не идет трансляция прокариотических мРНК и мРНК, выделенных из органелл (например, из митохондрий) [10]. Кроме того, если мРНК кодируют такие белки, для которых в ооците нет соответствующего клеточного компартмента, то продукты трансляции могут оказаться весьма нестабильными и их не удастся выявить в цитоплазме. Например, нам не удалось обнаружить какие бы то ни было продукты трансляции после инъекции мРНК ядерного происхождения, кодирующей хлоропластные белки гороха; точно так же не удалось обнаружить малатдегидрогеназу клещевины — фермент, предназначенный для глиоксисом (этих растительных органелл в ооците нет). В то же время препарат мРНК из клещевины дает при трансляции лектин, который, как и следовало предполагать, переносится в эндоплазматический ретикулум ооцита. В бесклеточных системах трансляции этот препарат мРНК обеспечивает синтез обоих белков.

Основное преимущество системы ооцитов — ее способность правильно модифицировать многие белки после трансляции. Однако модификация некоторых белков происходит не совсем правильно [31, 37]. К счастью, в ряде случаев это не имеет значения, даже если планируется проводить биологические испытания продуктов. Так, показано, что цепи мышиных иммуноглобулинов неправильно гликозилируются в ооцитах (рис. 14), но тем не менее эти цепи собираются и образуют биологически активные антитела [50]. Еще один подобный пример известен из литературы [51].

Итак, ооцит — весьма эффективная система трансляции. Однако использование этой системы оправданно только в определенных обстоятельствах, когда ее преимущества перед бесклеточными системами трансляции имеют особое значение. Сюда можно отнести ситуации, когда единственный реальный метод детектирования — биологическое испытание продукта, а также когда количество мРНК очень мало. Наконец, ооцит представляет собой идеальную систему для исследования посттрансляционных событий, особенно теперь, когда стало возможным осу-

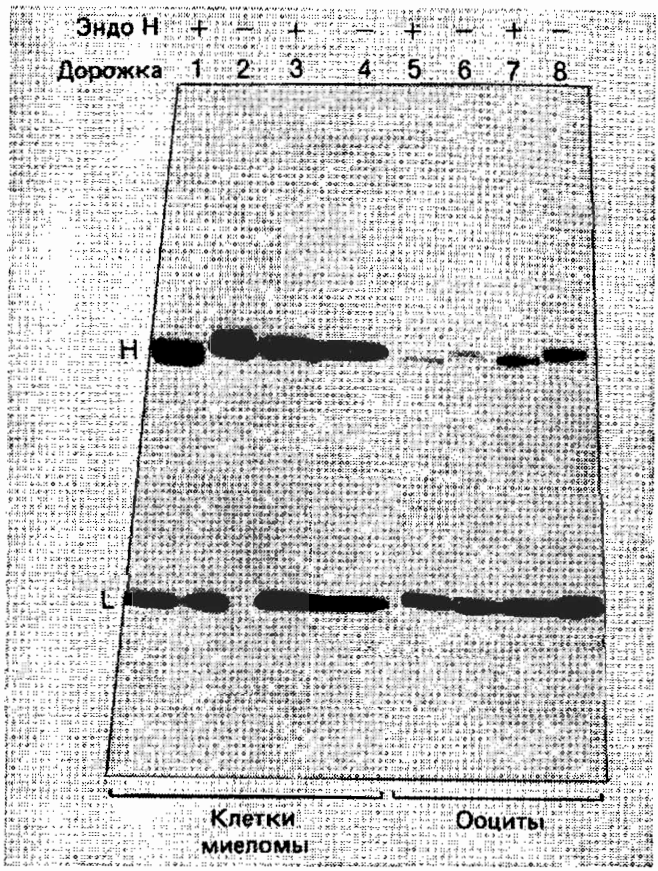


Рис. 14. Сравнение боковых олигосахаридных цепей, которые присоединяются к тяжелым цепям иммуноглобулинов в ооцитах и в клетках миеломы МОРС 21. Незадолго перед секрецией из клеток миеломы олигосахаридные боковые цепи тяжелых цепей иммуноглобулина переходят из «простой» в сложную форму. Только сложная форма устойчива к эндогликозидазе Н (эндо Н). Действие эндо Н на тяжелые цепи иммуноглобулина, выделенные из миеломных клеток (дорожки 1 и 2) или из инкубационной среды (дорожки 3 и 4), анализировали в 12,5%-ном ПААГ в восстанавливающих условиях. Секретированная тяжелая цепь устойчива к действию фермента. Та же самая тяжелая цепь, синтезированная в ооцитах после инъекции мРНК, наоборот, чувствительна к действию фермента, независимо от того, выделена она из клеток (дорожки 5 и 6) или секретирована в среду (дорожки 7 и 8). Легкая цепь не гликозилируется ни в каких клетках.

ществить в ооцитах синтез мутантных белков после инъекции клонированных ДНК, подвергнутых генетическим манипуляциям [76] (см. также гл. 2).

Литература

1. *Davidson E.* Gene Activity in Early Development (2nd Edn.), published by Academic Press Inc., New York and London, 1976.
2. *Woodland H.* Biosci. Rep., 2, 471 (1982).
3. *Gurdon J. B., Melton D. A.* Annu. Rev. Genet., 15, 189 (1981).
4. *Harland R. M., Laskey R. A.* Cell, 21, 761 (1980).
5. *Laskey R. A., Honda B. M., Mills A. D., Morris N. R., Wyllie A. H., Mertz J. E., De Robertis E. M., Gurdon J. B.* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 18, 643 (1978).
6. *Zehavi-Willner T., Lane C.* Cell, 11, 683 (1977).
7. *Lane C. D., Knowland J. S.* In: The Biochemistry of Animal Development, vol. 3, Weber R. A. (ed.), Academic Press Inc., New York and London, p. 145, 1975.
8. *Asselbergs F. M.* Mol. Biol. Rep., 5, 199 (1979).
9. *Marbaix G., Huez G.* In: The Transfer of Cell Constituents into Eukaryotic Cells, vol. 31, Celis J. E., Graessmann A. and Loyter A. (eds.), NATO Advanced Study Seriea A, Plenum Press, New York and London, p. 347, 1980.
10. *Lane C. D.* Curr. Top. Dev. Biol., 18, 89 (1983).
11. *Gurdon J. B., Lane C. D., Woodland H. R., Marbaix G.* Nature, 233, 177 (1971).
12. *De Robertis E. M., Partington G. A., Longthorne R. F., Gurdon J. B.* J. Embryol. Exp. Morphol., 40, 199 (1971).
13. *Rutgers T., Neeleman L., Van Vloten-Doting L., Cleuter Y., Hubert E., Huez G., Marbaix G.* Arch. Int. Physiol. Biochem., 84, 654 (1976).
14. *Salden M., Asselbergs F., Bloemendal H.* Nature, 259, 696 (1976).
15. *Katz R., Maniatis E., Guntaka R. V.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 86, 447 (1979).
16. *Rutgers T., Molen-Doting L., Marbaix G., Huez G., Hubert E., Cleuter Y.* 11th FEBS Meeting, Copenhagen, Abstracts A2-5/205/3 (1977).
17. *Ghysdael J., Kettmann R., Burny A.* J. Virol., 29, 1087 (1979).
18. *Kondo M., Marbaix G., Moens L., Huez G., Cleuter Y., Hubert E.* 10th FEBS Meeting, Paris, Abstract No. 352 (1975).
19. *Semancik J. S., Conejero V., Gerhart J.* Virology, 80, 218 (1977).
20. *Schwinghamer M., Symons R.* Virology, 79, 88 (1977).
21. *Laskey R., Mills H., Gurdon J., Partington G.* Cell, 11, 335 (1977).
22. *Littauer U., Soreq H., Cornelis P.* In: Enzyme Regulation on Mechanism of Action, Muldner P. and Reis B. (eds.), Pergamon, New York, p. 233, 1980.
23. *Hesselink W. G., Van der Kamp A., Bloemers H.* Virology, 110, 375 (1981).
24. *Nusse R., Asselbergs F., Salden M., Michalides R., Bloemendal H.* Virology, 91, 106 (1978).
25. *Lane C. D., Colman A., Mohun T., Morser J., Champion J., Kourides I., Craig R., Higgins S., James T. C., Appelbaum S. W., Ohlsson R. I., Paucha E., Houghton M., Mathews J., Miflin B. J.* Eur. J. Biochem., 111, 225 (1981).
26. *Wunner W., Curtis P., Wiktov T. J.* J. Virol., 36, 133 (1980).
27. *McCrae M., Woodland H.* Eur. J. Biochem., 116, 467 (1981).
28. *Knowland J.* Genetics, 78, 383 (1974).
29. *Matthews J., Brown J., Hall T.* Nature, 294, 175 (1981).
30. *Hurkman W., Smith L. D., Richter J., Larkins B. A.* J. Cell Biol., 89, 292 (1981).
31. *Lane C., Champion J., Haiml L., Kreil G.* Eur. J. Biochem., 113, 273 (1981).

32. *Lane C., Champion J., Colman A., James T., Applebaum S.* Eur. J. Biochem., 130, 529 (1983).
33. *Woodland H., Wilt F.* Dev. Biol., 75, 214 (1980).
34. *Asselbergs F., Koopmans M., Van Venrooij W., Bloemendal H.* Eur. J. Biochem., 91, 65 (1978).
35. *Asselbergs F., Koopmans M., Van Venrooij W., Bloemendal H.* Exp. Eye Res., 28, 475 (1979).
36. *Vassart G., Refetoff S., Brocas H., Dinsart C., Dumont J. E.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 4462 (1977).
37. *Rapoport T., Thiele B., Prehn S., Marbaix G., Cleuter Y., Hubert E., Huez G.* Eur. J. Biochem., 87, 229 (1978).
38. *Miledi R., Parker I., Sumikawa K.* EMBO J., 1, 1307 (1982).
39. *Colman A., Lane C., Craig R., Boulton A., Mohun T., Morser J.* Eur. J. Biochem., 113, 339 (1981).
40. *Chan L., Kohler P. O., O'Malley B. W.* J. Clin. Invest., 57, 576 (1976).
41. *Lane C. D., Gregory C. M., Morel C.* Eur. J. Biochem., 34, 219 (1973)
42. *Rollins J. W., Flickinger R.* Science (Wash.), 178, 1204 (1972).
43. *Lane C., Shannon S., Craig R.* Eur. J. Biochem., 101, 485 (1979).
44. *Reynolds R., PremKumar E., Pirha P.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 4881 (1975).
45. *Mous J., Peeters B., Rombauts W.* FEBS Lett., 122, 105 (1980).
46. *Lebleu B., Hubert E., Content J., De Wit L., Braude I., de Clercq E.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 82, 665 (1978).
47. *Jilka R., Calvalieri R., Yaffe L., Pestka S.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 79, 625 (1977).
48. *Valle G., Besley J., Williamson A., Mosmann T., Colman A.* Eur. J. Biochem., 132, 131 (1983).
49. *Valle G., Besley J., Colman A.* Nature, 291, 338 (1981).
50. *Valle G., Jones E., Colman A.* Nature, 300, 71 (1982).
51. *Labarca C., Paigen K.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 4462 (1977).
52. *Kourides I., Weintraub B.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 298 (1979).
53. *Kortbeek-Jacobs N., van der Donk H.* J. Immunol. Methods, 24, 195 (1978).
54. *Beato M., Rungger D.* FEBS Lett., 59, 305 (1975).
55. *Deacon N., Erbinger A.* FEBS Lett., 79, 191 (1977).
56. *Olhsson R., Lane C., Guengerich F.* Eur. J. Biochem., 115, 367 (1981).
57. *Higgins S., Colman A., Fuller F., Jackson P.* Mol. Cell Endocrinol., 21, 255 (1981).
58. *Mous J., Peeters B., Rombauts W., Heyns W.* Biochim. Biophys. Res. Commun., 79, 1111 (1977).
59. *Sumikawa K., Houghton M., Emtage J., Richards B., Barnard E.* Nature, 292, 862 (1981).
60. *Gedamu L., Dixon G., Gurdon J.* Exp. Cell Res., 117, 325 (1978).
61. *Berridge M., Lane C.* Cell, 8, 283 (1976).
62. *Colman A., Morser J.* Cell, 17, 517 (1979).
63. *Taniguichi M., Takuhisa T., Kanno M., Yaoita Y., Schimizu A., Hanjo T.* Nature, 298, 172 (1982).
64. *Gurdon J., Woodland H.* In: Handbook of Genetics, vol. 4, King R. (ed.), Plenum Press, New York and London, p. 35, 1967.
65. *Korn L., Gurdon J.* Nature, 289, 461 (1981).
66. *Kressmann A., Clarkson S., Pirotta V., Birnstiel M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1176 (1978).
67. *Bienz M., Gurdon J.* Cell, 29, 811 (1982).
68. *Gurdon J.* Control of Gene Expression in Animal Development, published by Oxford and Harvard University Press, London and New York, 1974.
69. *Richter J., Smith L.* Cell, 27, 183 (1981).
70. *Colman A., Besley J., Valle G.* J. Mol. Biol., 160, 459 (1982).

71. *Soreq H., Miskin R.* FEBS Lett., **128**, 305 (1981).
72. *Shih R., O'Connor C., Keem K., Smith L. D.* Dev. Biol., **66**, 172 (1978).
73. *Woodland H.* Dev. Biol., **68**, 360 (1979).
74. *Hames B. D.* In: Gel Electrophoresis of Proteins — A Preactical Approach, Hames B. D. and Rickwood D. (eds.), IRL Press, Oxford and Washington, DC, p. 1, 1981.
75. *Ford C., Gurdon J.* J. Embryol. Exp. Morphol., **37**, 203 (1977).
76. *McKnight S., Gavin E.* Nucleic Acids Res., **8**, 5931 (1980).

МАРКЕРЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ПОЛИПЕПТИДОВ[1]

С. Минтер и П. Сили

1. Маркеры ДНК

1.1. Плазмида pBR322

Фрагменты плазмиды pBR322 прекрасно подходят в качестве маркеров молекулярной массы ДНК. С помощью сравнительно небольшого набора рестриктаз можно получить маркерные фрагменты в широком диапазоне молекулярных масс. Следующие фрагменты рестрикции расщепляют плазмиду только в одном месте каждый, давая линейную молекулу длиной 4362 bp, которую используют в качестве маркера в агарозных гелях:
Aat II, *Ava* I, *Bal* I, *Bam* HI, *Cla* I, *Eco* RI, *Hind* III, *Nde* I, *Nru* I, *Pst* I, *Pvu* II, *Rru* I, *Sal* I, *Sph* I, *Tth* I, *Xma* III, *Xor* II.

В табл. 1 перечислены другие ферменты, которые расщепляют pBR322 в нескольких сайтах, а также приведены размеры фрагментов, образующихся при расщеплении.

1.2. Плазмида pAT153

pBR322 и pAT153 — родственные плазмиды. Плазмида pAT153 была получена из плазмиды pBR322 путем удаления из последней двух рестриктных фрагментов, образованных *Hae* II, а именно фрагмента B длиной 622 bp и фрагмента G длиной 83 bp [3]. Линейная молекула pAT153 имеет длину 3657 bp и может быть получена под действием любого из следующих ферментов:
Aat II, *Acc* I, *Ava* I, *Bal* I, *Bam* HI, *Cla* I, *Eco* K, *Eco* RV, *Hind* III, *Nru* I, *Pst* I, *Rru* I, *Sal* I, *Sph* I, *Xma* III, *Xmn* I, *Xor* II.
В табл. 2 перечислены другие ферменты, которые расщепляют pAT153 в нескольких сайтах, а также приведены размеры фрагментов, образующихся при расщеплении.

1.3. Бактериофаг лямбда (λ)

Бактериофаг λ — наиболее изученный фаг *Escherichia coli*. Определена последовательность ДНК штамма λ cI *indI ts* 857 Sam 7 [4]. Нативная молекула ДНК кольцевая и двухцепочеч-

[1] Это приложение составлено на основании опубликованной ранее сводки [1], расширенной и дополненной новыми данными.

Таблица 1. Размеры рестриктных фрагментов плазмиды pBR322[1, 2, 3]

*Bvu*I	*Hinc*II	*Acc*I	*Xmn*I	*Eco*K	*Aha*III	*Bgl*I	*Rsa*I	*Nar*I	*Nae*I	*Thn*II
4348	3256	2767	2430	2377	3651	2319	2117	3571	3481	3196
14	1106	1595	1932	1985	692	1809	1565	657	367	1127
					19	234	680	113	354	32
								21	160	7
*Mst*I	*Hgi*DI	*Bst*NI	*Taq*I	*Ava*II	*Dde*I	*Hgi*AI	*Hgi*CI	*Hinf*I	*Hae*II	*Hga*I
2134	2699	1857	1444	1746	1652	1161	2027	1631	1876	867
1095	657	1060	1307	1433	542	826	1123	517	622	731
1035	490	928	475	303	540	604	439	506	439	633
98	382	383	368	279	465	587	294	396	430	578
	113	121	315	249	426	498	218	344	370	415
	21	13	312	222	409	310	113	298	227	314
			141	88	166	291	84	221	181	245
				42	162	85	43	220	83	239
							21	154	60	158
								75	53	150
									21	32
*Nci*I	*Mbo*II	*Fok*I	*Hph*I	*Sau*96	*Alu*I	*Scr*FI	*Sau*3A	*Sfa*NI	*Hae*III	*Tac*I
724	790	1171	1106	1461	910	696	1374	1052	587	581
699	755	853	853	616	659	592	665	424	540	493
696	753	659	576	352	655	525	358	395	504	452
632	592	649	415	279	521	363	341	375	458	372
363	492	287	387	274	403	351	317	248	434	355
351	271	188	282	249	281	347	272	243	267	341
328	254	181	227	222	257	328	258	234	234	332
308	196	141	221	191	226	308	207	223	213	330
226	109	78	207	189	136	218	105	220	192	145
35	78	62	45	179	100	199	91	192	184	129
	72	48	34	124	63	184	78	164	124	129
		45	9	88	57	121	75	134	123	122
				79	49	42	46	96	104	115
				42	19	40	36	88	89	103
				17	15	35	31	78	80	97
					11	13	27	63	64	69
							18	39	57	66
							17	37	51	61
							15	25	21	27
							12	12	18	26
							11	11	11	10
							8	9	7	5
										2

[1] Ферменты перечислены в порядке увеличения числа фрагментов, которые они образуют.

[2] Размер фрагментов указан в парах оснований (bp). В эти фрагменты не включены одноцепочечные участки, которые могут образовываться при действии рестриктаз.

[3] Данные получены с помощью машинной обработки последовательности нуклеотидов pBR322 [2], заложенной в библиотеку последовательностей ДНК Европейского общества молекулярной биологии (EMBO).

*Hpa*II	*Mnl*I	*Hha*I	*Fnu*4H
622	591	393	480
527	400	348	328
404	334	337	299
309	262	332	277
242	247	270	229
238	218	259	206
217	206	206	189
201	206	190	165
190	206	174	155
180	204	153	150
160	185	152	143
160	179	151	129
147	166	141	123
147	156	132	119
122	150	131	118
110	96	109	116
90	88	103	107
76	81	100	97
67	77	93	95
34	61	83	85
34	60	75	83
26	58	67	81
26	38	62	79
15	36	60	71
9	30	53	65
9	27	40	57
		36	53
		33	51
		30	46
		28	45
		21	34
			27
			18
			14
			7
			3
			3
			3
			3
			3
			3
			3

Таблица 2. Размеры рестриктных фрагментов плазмиды pAT153[1]

*Bvu*I	*Rsa*I	*Hinc*II	*Tth*111	*Aha*III	*Bgl*I	*Nar*I	*Nae*I	*Mst*I	*Hgi*DI	*Bst*NI	*Dde*I
3643	3486	2551	3618	2946	1809	2866	2776	1429	1994	1857	1652
14	165	1106	32	692	1614	657	367	1095	657	928	540
			7	19	234	113	354	1035	490	383	464
						21	160	98	382	355	426
									113	121	409
									21	13	166

*Fok*I	*Taq*I	*Ava*II	*Hgi*AI	*Nci*I	*Hae*II	*Hin*fI	*Hgi*CI	*Hga*I	*Hph*I	*Mbo*II	*Alu*I
1584	1444	1433	1161	724	1876	1631	1322	867	986	790	659
853	602	1320	619	696	439	517	1117	731	853	755	655
659	475	303	604	665	430	396	439	578	415	592	622
287	368	249	587	632	370	298	294	501	387	492	521
181	315	222	310	363	227	221	218	314	282	271	403
48	312	88	291	351	181	220	113	245	227	254	257
45	141	42	85	226	60	154	84	239	221	196	226
					53	145	43	150	207	109	136
					21	75	21	32	45	78	100
									34	72	63
										48	15

*Sau*96	*Sfa*NI	*Scr*FI	*Tac*I	*Sau*3A	*Mnl*I	*Hae*III	*Hpa*II	*Hha*I	*Fnu*4H
1224	1052	696	581	876	591	587	622	393	480
616	437	592	493	665	400	458	492	337	328
352	424	525	452	358	247	434	404	332	277
274	395	363	355	341	218	339	242	270	229
249	375	351	332	317	206	267	238	259	206
222	248	313	330	272	206	234	217	206	189
191	234	218	182	258	206	213	201	190	165
179	192	199	145	105	204	192	190	174	155
124	164	184	129	91	200	184	160	153	150
88	88	121	129	78	179	124	160	152	143
79	25	42	122	75	166	123	147	151	129
42	12	40	115	46	156	104	122	132	119
17	11	13	97	36	150	89	110	131	118
			66	31	96	80	90	109	113
			61	27	88	64	76	100	107
			27	18	81	57	67	93	95
			26	17	77	51	34	75	85
			10	15	61	21	26	67	83
			5	12	60	18	26	62	79
				11	38	11	15	60	71
				8	27	7	9	53	65
							9	40	57
								36	51
								33	45
								28	34
								21	27
									18
									14
									7
									3 x 6

Таблица 3. Размеры рестриктных фрагментов ДНК фага λ (штамм c1*ts* 857)[1, 2]

*Xho*I	*Xba*I	*Sal*I	*Kpn*I	*Sst*I	*Avr*II	*Sma*I	*Pvu*I
33 498	24 508	32 745	29 942	24 776	24 322	19 399	14 321
15 004	23 994	15 258	17 057	22 621	24 106	12 220	12 712
		499	1503	1105	74	8612	11 936
						8271	9533
*Sst*II	*Eco*RI	*Bam*HI	*Bgl*II	*Hind*III	*Ava*I	*Hpa*I	*Pvu*II
20 323	21 226	16 841	22 010	23 130	14 677	8666	21 088
18 780	7421	7233	13 286	9416	8614	6911	4421
8113	5804	6770	9688	6557	6888	5414	4268
1076	5643	6527	2392	4361	4720	4535	4194
210	4878	5626	651	2322	4716	4491	3916
	3530	5505	415	2027	3730	4347	3638
			60	564	1881	3408	2296
				125	1674	3384	1708
					1602	3042	636
						2240	579
						734	532
						441	468
						410	343
						251	211
						228	141
							63

[1] См. сноски 1 и 2 к табл. 1.
[2] Данные основаны на анализе последовательности ДНК фага λ cI *ts* 857, содержащейся в банке последовательностей EMBO.

ная. При нагревании в течение 10 мин при 68 °С при низкой концентрации соли и последующем быстром охлаждении происходит расхождение липких концов в «cos»-сайте. В результате образуется линейная молекула с одноцепочечными липкими концами длиной 12 нуклеотидов. В табл. 3 перечислены размеры фрагментов, которые образуются под действием ряда рестриктаз.

1.4. Обезьяний вирус 40 (SV40)

Геном SV40 представляет собой кольцевую двухцепочечную ДНК длиной 5243 bp. Она может быть переведена в линейную форму рестриктазами *Acc* I, *Bam* HI, *Eco* RI, *Eco* RV, *Hae* II, *Kpn* I, *Msp* I (*Hpa* II), *Nae* I или *Taq* I. В табл. 4 перечислены другие ферменты, которые расщепляют ДНК SV40 в нескольких сайтах, а также приведены размеры фрагментов, образующихся при расщеплении.

Таблица 4. Размеры рестриктных фрагментов ДНК SV40[1, 2, 3]

*Hha*I	*Nde*I	*Pst*I	*Xho*II	*Pvu*II	*Hph*I	*Hpa*I	*Ava*II
4753	4225	4027	3007	2007	3091	2147	1580
490	1018	1216	1566	1719	1856	2009	1525
			760	1446	160	1067	995
					136	20	682
							430
							31

*Hind*III	*Hin*cII	*Mbo*II	*Hinf*I	*Hae*I	*Aha*III	*Rsa*I	*Mbo*II
1768	1980	1347	1845	1739	1753	1605	1350
1169	1538	1264	1085	1661	739	708	756
1116	1067	945	766	383	565	675	687
526	369	610	543	348	430	551	645
447	240	396	525	329	411	497	409
215	29	384	237	300	364	351	395
	20	234	109	227	318	294	383
		60	83	179	315	226	375
			24	33	141	153	69
			24	30	136	111	65
				14	71	57	31
						15	30
							14
							13
							11
							10

*Hae*III	*Alu*I	
1661	775	46
765	483	41
540	329	38
373	288	30
329	275	29
325	253	28
300	253	27
299	243	12
227	224	10
179	223	8
49	177	7
45	157	
41	154	
33	153	
30	146	
29	144	
14	123	
9	75	
6	54	
	53	
	50	
	49	

[1] См. сноски 1 и 2 к табл. 1.
[2] Данные основаны на анализе опубликованной последовательности ДНК SV40 [5, 6].
[3] Следующие рестриктазы не расщепляют ДНК SV40: *Ava* I, *Bgl* II, *Cla* I, *Fnu* DII, *Pvu* I, *Sal* I, *Sma* I, *Xba* I, *Xho* I или *Xma* II.

1.5. Колифаг M13mp7

Фаг M13mp7 — распространенный вектор для клонирования и секвенирования; он содержит кольцевую одноцепочечную молекулу ДНК длиной 7238 bp. Репликативная форма (RF) представляет собой двухцепочечную кольцевую ДНК. Ее можно перевести в линейную форму с помощью рестриктаз *Acy* I, *Ava* I, *Ava* II, *Avr* I, *Bgl* I, *Bgl* II, *Mst* II, *Nae* I, *Nar* I, *Pvu* I, *Pst* I, *Sau* I, *Sua* I. В табл. 5 перечислены другие ферменты, которые расщепляют RF в нескольких сайтах, а также приведены размеры фрагментов, образующихся при расщеплении.

1.6. Бактериофаг ϕX174

Этот бактериофаг *E. coli* имеет одноцепочечную молекулу ДНК. Репликативная форма двухцепочечная и имеет длину 5386 bp. Ее можно перевести в линейную форму рестриктазами *Ava* I, *Ava* II, *Mst* II, *Pst* I, *Sac* II или *Xho* I. В табл. 6 перечислены другие ферменты, которые расщепляют ее в нескольких сайтах, а также приведены размеры фрагментов, образующихся при расщеплении.

1.7. Колифаг fd

Этот колифаг, заражающий F^+-клетки, близкородствен фагу M13. Вирион содержит одноцепочечную кольцевую молекулу ДНК длиной 6408 нуклеотидов. Репликативную форму ДНК fd можно перевести в линейную форму с помощью рестриктаз *Acc* I или *Hinc* II. В табл. 7 перечислены ферменты, которые расщепляют ее в нескольких сайтах, а также приведены размеры фрагментов, образующихся при расщеплении.

2. Маркеры РНК

РНК можно разделять с помощью электрофореза в неденатурирующих гелях агарозы или полиакриламида или в денатурирующих гелях — в агарозе в присутствии метилртутьгидроксида или в полиакриламидных гелях в присутствии 98% формамида или 8 М мочевины [9]. Поэтому кажущаяся молекулярная масса зависит от условий электрофореза. Помимо молекул РНК, перечисленных в табл. 8, в качестве маркеров молекулярной массы в некоторых случаях можно использовать фрагменты ДНК, образованные рестриктазами (табл. 1—7).

3. Маркеры молекулярной массы полипептидов

В табл. 9 перечислены некоторые полипептиды с известной молекулярной массой, которые часто используют в качестве маркеров при электрофорезе в ПААГ—ДСН.

Таблица 5. Размеры рестриктных фрагментов ДНК фага M13mp7[1, 2]

*Acc*I	*Sal*I	*Hinc*II	*Bam*HI	*Eco*RI	*Gdi*II	*Pvu*II	*Hgi*AI	*Xmn*I	*Cla*I
7226	7226	7226	7214	7196	6993	6835	6516	4949	4343
12	12	12	24	42	245	310	722	2289	2895
*Asu*I	*Cau*II	*Nci*I	*Xho*I	*Hae*I	*Hgi*CI	*Hae*II	*Eco*RII	*Sfa*NI	*Hga*I
6578	4313	4313	4020	2836	4428	3514	3975	2625	1638
446	4162	2336	2535	2813	2022	2520	1809	1684	1517
190	558	558	659	1325	324	434	952	966	1089
24	31	31	24	264	322	433	179	871	1075
					130	329	139	716	846
					12	8	127	363	758
							57	13	315
*Sau*3A	*Bbv*I	*Kpn*I	*Taq*I	*Hae*III	*Fnu*4HI	*Hph*I	*Rsa*I	*Fnu*DII	*Hpa*II
4020	1826	1694	1018	2527	1826	2212	1345	1290	1596
1696	1739	1241	971	1623	1739	1595	1334	889	829
507	1154	1226	927	849	891	1013	1004	772	818
434	665	792	703	341	629	589	742	681	651
332	611	666	639	311	611	489	604	646	545
129	436	332	612	309	436	271	522	541	543
96	420	318	579	245	420	241	322	496	472
24	387	301	564	214	387	194	258	495	454
		196	441	169	164	144	201	361	357
		196	381	158	45	135	190	353	183
		163	239	117	27	127	163	304	176
		113	152	106	24	76	143	190	156
			12	102	22	39	107	63	130
				98	14	39	102	57	123
				69	3	33	93	54	79
						26	65	24	60
						9	27	20	30
						6	16	2	18
									18

[1] См. сноски 1 и 2 к табл. 1.
[2] Следующие рестриктазы не расщепляют ДНК M13 mp7: *Bst* E II, *Hind* III, *Hpa* I, *Kpn* I, *Mst* I, *Sma* I, *Xho* I или *Xma* I.

*Hha*I	*Alu*I	*Hinf*I	*Dde*I	*Eco*RI*	*Mnl*I	
967	1446	1288	998	1402	423	31
732	1330	771	866	665	421	30
725	600	571	672	567	391	28
714	555	486	652	508	384	27
683	484	413	600	416	351	22
495	336	348	563	406	340	21
434	331	345	399	323	318	19
340	313	328	381	283	313	18
329	220	324	376	272	304	16
312	204	274	303	247	286	15
293	201	261	294	213	269	15
272	180	253	272	209	263	15
244	159	234	160	176	243	15
190	151	232	153	174	234	15
115	140	212	128	152	226	15
92	111	209	72	142	217	15
74	111	160	63	109	158	15
65	104	137	46	109	143	12
56	93	96	42	102	130	8
28	72	80	39	99	119	6
26	63	63	28	96	117	5
22	39	46	27	88	111	4
13	39	45	24	76	105	4
9	27	22	15	69	102	
8	26	21	15	63	98	
	24	19	15	55	90	
			15	53	86	
			15	41	76	
			14	40	74	
				36	69	
				33	66	
				12	63	
				1	51	
				1	49	
					48	
					48	
					43	
					38	

Таблица 6. Размеры рестриктных фрагментов ДНК фага φX174[1, 2] [7]

*Aha*III	*Nar*I	*Acc*I	*Eco*RII	*Xmn*I	*Hpa*II	*Hae*I
4307	3429	3034	2767	4126	2748	2712
1079	1957	2352	2619	974	1697	872
				286	374	738
					348	603
					219	389
						72
*Hae*II	*Hph*I	*Taq*I	*Rsa*I	*Hae*III	*Mbo*II	*Hinc*II
2314	1638	2914	1560	1353	1103	1057
1560	1116	1175	964	1078	1066	770
786	791	404	645	872	857	612
269	777	327	525	605	812	495
185	777	321	472	310	396	397
125	110	141	392	281	394	392
93	77	87	247	271	324	345
54	43	54	197	232	224	341
	39	33	157	194	118	335
		20	138	118	89	291
			89	72	3	210
						162
						79
*Dde*I	*Fnu*DII	*Hha*I				
1012	1050	1553				
998	870	640				
927	718	614				
542	695	532				
486	530	305				
393	490	300				
303	259	269				
302	176	201				
186	156	192				
165	127	145				
38	114	143				
18	103	123				
10	79	101				
6	19	93				
		84				
		54				
		35				
		2				

[1] См. сноски 1 и 2 к табл. 1.

[2] *Hinf* I дает 21 фрагмент, а *Alu* I дает 24 фрагмента. Следующие рестриктазы не расщепляют ДНК фага φX174: *Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* III, *Nae* I, *Pvu* I, *Pvu* II, *Sal* I, *Sma* I, *Xba* I или *Xho* II.

Таблица 7. Размеры рестриктных фрагментов ДНК фага ϕX174[1, 2] [7]

*Bam*HI	*Hae*II	*Mbo*II	*Hae*III	*Taq*I	*Msp*I(*Hpa*II)	*Alu*I
3425	3550	4349	2528	2019	1596	1446
2983	2033	666	1633	850	829	1330
	817	384	849	703	819	705
	8	332	352	652	652	554
		318	311	579	648	484
		196	309	441	501	366
		163	154	381	454	314
			106	357	381	257
			103	287	156	220
			69	139	129	204
					123	201
					60	166
					42	111
					12	29
					6	27
						24

[1] См. сноски 1 и 2 к табл. 1.
[2] *Hinf* I дает 24 фрагмента, а *Mnl* I — 51 фрагмент. Рестриктазы *Bcl* I, *Eco* RI, *Hind* III или *Kpn* I не расщепляют ДНК фага fd.

Таблица 8. Маркеры молекулярной массы для гель-электрофореза РНК

РНК	Молекулярная масса[1]	Число нуклеотидов	Источник данных
мРНК тяжелой цепи миозина кур	$2{,}02 \cdot 10^6$	6500	[13][3]
28S-рРНК (HeLa)[4]	$1{,}90 \cdot 10^6$	6333	[10]
25S-рРНК (*Aspergillus*)[4]	$1{,}24 \cdot 10^6$	4000	[19]
23S-рРНК (*E. coli*)[4]	$1{,}07 \cdot 10^6$	3566	[11]
18S-рРНК (HeLa)[4]	$0{,}71 \cdot 10^6$	2366	[10]
17S-рРНК (*Aspergillus*)[4]	$0{,}62 \cdot 10^6$	2000	[19]
16S-рРНК (*E. coli*)[4]	$0{,}53 \cdot 10^6$	1776	[12][3]
мРНК кристаллина А2 из хрусталика телепка	$0{,}45 \cdot 10^6$	1460	[14]
мРНК легкой цепи иммуноглобулина мыши	$0{,}39 \cdot 10^6$	1250	[15][3]
мРНК β-глобина мыши	$0{,}24 \cdot 10^6$	783	[16]
мРНК β-глобина кролика	$0{,}22 \cdot 10^6$	710	[17][3]
мРНК α-глобина мыши	$0{,}22 \cdot 10^6$	696	[16]
мРНК α-глобина кролика	$0{,}20 \cdot 10^6$	630	[17]
мРНК гистона Н4 морского ежа	$0{,}13 \cdot 10^6$	410	[18][3]
5,8S-РНК (*Aspergillus*)	$4{,}89 \cdot 10^4$	158	[19][2]
5S-РНК (*E. coli*)	$3{,}72 \cdot 10^4$	120	[20]
4S-РНК (*Aspergillus*)	$2{,}63 \cdot 10^4$	85	[19]

[1] Молекулярные массы представляют собой приближенные величины; они вычислены, исходя из средней молекулярной массы нуклеотида, равной 310 Да.
[2] При неденатурирующем гель-электрофорезе.
[3] При денатурирующем гель-электрофорезе в присутствии формамида.
[4] Существует более обширный перечень размеров различных рРНК [21].

Таблица 9. Молекулярные массы полипептидов, используемых в качестве маркеров [1, 2, 3]

Полипептид	Молекулярная масса, кДа
Тяжелая цепь миозина из мышц кролика	212
β′-Субъединица РНК-полимеразы *E. coli*	165
β-Субъединица РНК-полимеразы *E. coli*	155
β-Галактозидаза *E. coli*	130
Фосфорилаза *a* из мышц кролика	92,5
Бычий сывороточный альбумин	68
Каталаза из печени быка	57,5
Пируваткиназа из мышц кролика	57,2
Глутаматдегидрогеназа из печени быка	53
Фумараза из печени свиньи	48,5
Овальбумин	43
Енолаза из мышц кролика	42
Алкогольдегидрогеназа из печени лошади	41
Альдолаза из мышц кролика	40
α-Субъединица РНК-полимеразы *E. coli*	39
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа из мышц кролика	36
Лактатдегидрогеназа из сердца свиньи	36
Карбоангидраза	29
Химотрипсиноген А	25,7
Ингибитор трипсина из сои	20,1
Миоглобин из сердца лошади	16,95
α-Лактальбумин из коровьего молока	14,4
Лизоцим яичного белка	14,3
Цитохром *c*	11,7

[1] В работе, из которой взята эта таблица [22], можно найти ссылки на оригинальные работы.

[2] Многие исследователи использовали в качестве маркеров молекулярной массы различные протеазы, например трипсин, химотрипсин и папаин, однако эти ферменты в определенных условиях могут вызывать протеолиз других полипептидов-маркеров и поэтому не включены в таблицу.

[3] В диапазоне молекулярных масс 12—68 кДа имеется достаточное число маркерных белков, но белков большего размера, пригодных для калибровки, немного. В качестве таких маркеров можно использовать полипептиды, ковалентно сшитые с образованием ряда олигомеров [22]. Препараты подобных сшитых олигомеров продает ряд фирм.

Литература

1. *Rickwood D., Hames B. D., eds.* Gel Electrophoresis of Nucleic Acids — A Practical Approach, IRL Press Ltd., Oxford and Washington, DC, 1982.
2. *Sutcliffe J. G.* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **43**, 77 (1979).
3. *Twigg A. J., Sherrat D.* Nature, **283**, 216 (1980).
4. *Sanger F., Coulson A. R., Hong G. F., Hill D. F., Petersen G. B.* J. Mol. Biol., **162**, 729 (1982).
5. *Fiers W., Contreras R., Haegeman G., Rogiers R. Van de Voorde A., Van Heuverswyn H., Van Herreweghe J., Volckaert G., Ysebaert M.* Nature, **273**, 113 (1978).
6. *Van Henversuryn H., Fiers W.* Eur. J. Biochem., **100**, 50 (1979).
7. *Sanger F., Coulson A. R., Friedmann T., Air G. M., Barrell B. G., Brown N. L., Fiddes J. C., Hutchison C. A., Slocombe P. M., Smith M.* J. Mol. Biol., **125**, 225 (1978).

8. *Beck F., Sommer R., Auerswald E. A., Kurz Ch., Zink B., Osterburg G., Schaller H.* Nucleic Acids Res., 5, 4495 (1978).
9. *Grierson D.* In: Gel Electrophoresis of Nucleic Acids — A Practical Approach, Rickwood D. and Hames B. D. (eds.), IRL Press Ltd., Oxford and Washington, DC, p. 1, 1982.
10. *McConkey E., Hopkins J.* J. Mol. Biol., **39**, 545 (1969).
11. *Stanley W. M., Bock R. M.* Biochemistry (Wash.), **4**, 1302 (1965).
12. *Pearce T. C., Rowe A. J., Turnock G.* J. Mol. Biol., **97**, 193 (1975).
13. *Mondal H., Sutton A., Chen V. J., Sarkar S.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **56**, 988 (1974).
14. *Berns A., Jansson P., Bloemendal H.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **59**, 1157 (1974).
15. *Stravnezer J., Huang R. C. C., Stravnezer E., Bishop J. M.* J. Mol. Biol., **88**, 43 (1974).
16. *Morrison M. R., Lingrel J. B.* Biochim. Biophys. Acta, **447**, 104 (1976).
17. *Hamlyn P. H., Gould H. J.* J. Mol. Biol., **94**, 101 (1973).
18. *Grunstein M., Schedl P.* J. Mol. Biol., **104**, 323 (1976).
19. *Scazzochio C.* Personal communication.
20. *Brownlee G., Sanger F., Barrell B. G.* J. Mol. Biol., **34**, 379 (1968).
21. *Loening U. E.* J. Mol. Biol., **38**, 355 (1968).
22. *Hames B. D.* In: Gel Electrophoresis of Proteins — A Practical Approach, Hames B. D. and Rickwood D. (eds.), IRL Press Ltd., Oxford and Washington, DC, p. 1, 1981.

ФИРМЫ — ПОСТАВЩИКИ ОБОРУДОВАНИЯ И РЕАКТИВОВ

Многие крупные компании имеют дочерние фирмы в других странах, а большинство мелких фирм продает свои продукты через представителей. В следующем списке приведены, как правило, адреса главных отделений, по которым легко выяснить адрес регионального представителя той или иной фирмы.

Amersham International Ltd., White Lion Road, Amersham HP7 9LL, Bucks., UK.
BDH Chemicals Ltd., Poole BH12 4NN, Dorset. UK
Beckman Instruments Inc., Spinco Division, Palo Alto, CA 94304, USA
Bethesda Research Laboratories Inc. (BRL), P. O. Box 577, Gaithersburg, MD 20760, USA
Bio-Rad Laboratories Inc., 2200 Wright Avenue, Richmond, CA 94804, USA
Boehringer Mannheim GmbH Biochemica, Postfach 31020, D-6800 Mannheim 31, FRG
Branson Sonic Power Inc., Eagle Road, Danbury, CT 06810, USA
BRL, see Bethesda Research Laboratories Inc.
Calbiochem-Behring, La Jolla, CA 92037, USA
Cambridge Biotechnology Laboratories Ltd., Uniscience Ltd., 12—14 St. Ann's Crescent, London SW18 2LS, UK
Collaborative Research Inc., 1365 Main Street, Waltham, MA 02154, USA
Difco Laboratories Ltd., P. O. Box 14B, Central Avenue, East Molesey, Surrey KT8 OSE, UK
Du Pont Instruments, Peck's Lane, Newtown, CT 06470, USA
Eastman-Kodak Co., 343 State Street, Rochester, NY 14650, USA
Eli Lilly Co., Indianapolis, IN, USA
Enzo-Biochem Inc., 325 Hudson Street, New York, NY 10013, USA
Ernst Leitz Wetzler GmbH, D-6330 Wetzler, FRG
Fisons Chemicals Ltd., Bishop Meadow Road, Loughborough LE11 ORG, UK
Flow Laboratories Inc., 7655 Old Springhouse Road, McLean, VA 22102, USA
Fluka AG, CH-9470 Buchs, Switzerland

Fuji Photofilm Co., 26—30 Nishiazabu 2-chome, Minato-ku, Tokyo 106, Japan
Gallenkamp Co. Ltd., Technico House, Christopher Street, London, EC2P 2ER, UK
Gibco-Biocult, The Dexter Corp., P. O. Box 200, Pine and Mogul Streets, Chagrin Falls, OH 44022, USA
Kodak, see Eastman-Kodak
Leitz, see Ernst Leitz Wetzler GmbH
May and Baker Ltd., Liverpool Road, Barton Moss, Eccles, Manchester M30 7RT, UK
Merck GmbH, D-6100 Darmstadt, FRG
Microinstruments (Oxford) Ltd., see Oxford Microinstruments Ltd.
Miles Laboratories Inc., Research Products Division, P. O. Box 2000, 1127 Myrtyle Street, Elkhart, IN 46515, USA
Minnesota Mining Co., 3M Center, Paul, MN 55101, USA
MSE Scientific Instruments, Manor Royal, Crawley RH10 2QQ, UK
Nasco Inc., 901 Janesville Avenue, Fort Atkinson, WI 53538, USA
New England Biolabs Inc. (NEN), 32 Tozer Road, Beverley, MA 01915, USA
New England Nuclear Research Products, 549 Albany Street, Boston, MA 02118, USA
Olympus Optical Co., 43—2 Hatagaya 2-chome, Shibuya-ku, Tokyo, Japan
Oxford Microinstruments Ltd., 7 Little Clarendon Street, Oxford OXI 2HP, UK
Oxoid Ltd., Wade Road, Basingstoke RG24 OPW, UK
Pharmacia Fine Chemicals AB, P. O. Box 175, S-75104 Uppsala-1, Sweden
Pierce Chemical Co., P. O. Box 117, Rockford, IL 61105, USA
P-L Biochemicals Inc., see Pharmacia Fine Chemicals AB
P and S Biochemicals, 38 Queensland Street, Liverpool L7 3JG, UK
Research Instruments Ltd., Kernick Road, Penryn, Cornwall TR10 9DQ, UK
Schleicher and Schuell GmbH, Postfach 4, D-3354 Dassel, FRG
Searle Bioscience Ltd., Harbour Estate, Sheerness, Kent ME12 IRZ, UK
Serva Feinbiochemica GmbH, Postfach 105260, D-6900 Heidelberg 1, FRG
Sigma Chemical Co., 3500 Dekalb Street, St. Louis, MO 63118, USA
Singer Instrument Co., Treborough Lodge, Roadwater, Watchet, Somerset TA23 OQL, UK
Sorvall, see Du Pont Instruments

South African Snake Farm, P. O. Box 6, Fish Hoek, Cape Province, Republic of South Africa
Sterile Systems Inc., P. O. Box 387, Logan, UT 84321, USA
Wellcome Reagents Ltd., Beckenham, Kent, UK
Whatman Laboratory Products Ltd., Springfield Mill, Maidstone ME14 2LE, UK
Worthington Biochemical Corporation, P. O. Box 650, Halls Mill Road, Freehold, NJ 07728, USA
WP Instruments Inc., P. O. Box 3110, 60 Fitch Street, New Haven, CT 06515, USA
Xenopus Ltd., Homesdale Nursery, Mid Street, South Nuffield RH1 4JY, UK

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БОЕ	бляшкообразующие единицы
БСА	бычий сывороточный альбумин
ВТМ	вирус табачной мозаики
ВЭМК	вирус энцефаломиокардита
ГМБА	гексаметиленбисацетамид
гяРНК	гетерогенная ядерная РНК
ДМСО	диметилсульфоксид
ДСН	додецилсульфат натрия
ДТТ	дитиотрейтол
ДЭАЭ	диэтиламиноэтил
ДЭПК	диэтилпирокарбонат
ПААГ	полиакриламидный гель
ПЭГ	полиэтиленгликоль
ТК	тимидинкиназа
Трицин	N-[2-гидрокси-1,1-бис(гидроксиметил)этил]глицин
ТХУ	трихлоруксусная кислота
ЭГТА	этиленгликольбис(β-аминоэтил)тетраацетат
ЭДТА	этилендиаминтетраацетат
bp	пары оснований (от англ. base pairs)
BPV	вирус папилломы быка
CAT	хлорамфениколацетилтрансфераза
HAT-среда	среда с гипоксантином, аминоптерином и тимидином (от англ. hypoxanthine-aminopterin-thymidine)
HBS	солевой раствор, забуференный HEPES
HEPES	N-2-гидроксиэтилпиперазин - N′-2-этансульфоновая кислота (от англ. N-2-hydroxyethylpiperazine-N′-2-ethanesulfonic acid)
HSV-1	вирус простого герпеса, тип 1
kb	тысячи пар оснований (от англ. kilobases)
MMTV	вирус опухолей молочной железы мышей (от англ. mouse mammary tumor virus)
MoMuSV	вирус мышиной саркомы Молони (от англ. Moloney murine sarcoma virus)
MOPS	3-(N-морфолино)пропансульфоновая кислота [от англ. 3-(N-morpholino)propanesulphonic acid]
NP-40	нонидет P-40

PBS	солевой раствор, забуференный фосфатом
PIPES	пиперазин-N,N′-бис-2-этансульфоновая кислота (от англ. piperazine-N,N′-bis-2-ethanesulphonic acid)
PMSF	фенилметилсульфонилфторид (от англ. phenylmethylsulphonyl fluoride)
SV40	вирус SV40
TEMED	N,N,N′,N′-тетраметилэтилендиамин (от англ. N,N,N′,N′-tetramethylethylenediamine).

Список авторов

Michael J. Clemens. Cancer Research Campaign Mammalian Protein Synthesis and Interferon Research Group, Department of Biochemistry, St. George's Hospital Medical School, London, UK.
Alan Colman. Department of Biological Sciences, University of Warwick, UK.
R. Stewart Gilmour. Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow, UK.
J. B. Gurdon. Cancer Research Campaign Molecular Embryology Group, Department of Zoology, Cambridge, UK.
I. Barry Holland. Department of Genetics, University of Leicester, UK.
Ru Chih C. Huang. Department of Biology, Johns Hopkins University, Baltimore, USA.
James L. Manley. Department of Biological Sciences, Columbia University, New York, USA.
William F. Marzluff. Department of Chemistry, The Florida State University, USA.
Stephen J. Minter. Department of Molecular Biology, University of Manchester Institute of Science and Technology (UMIST), Manchester, UK.
Julie M. Pratt. Department of Genetics, University of Leicester, Leicester, UK.
Paul G. Sealey. MRC Mammalian Genome Unit, Department of Zoology, University of Edinburgh, Edinburgh, UK.
Demetrios A. Spandidos. Wolfson Laboratory for Molecular Pathology, The Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow, UK.
Neil G. Stoker. Imperial Cancer Research Fund Laboratories, London, UK.
Neil M. Wilkie. Wolfson Laboratory for Molecular Pathology, The Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow, UK.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Агар «триптиказный» 189
Актиномицин D 167, 173
α-Аманитин 84, 97—98, 121—122, 178
Аминоацил-тРНК — синтетазы, получение 315
Аминогликозид—фосфотрансфераза (APH) 38
Аминокислотная последовательность, определение 308
Аминокислоты, размеры пулов в ооцитах *Xenopus* 346, 347
— эндогенный пул в лизате ретикулоцитов 283, 284

Бактериофаг лямбда (λ) 365
— ϕX174 371
Барта солевой раствор 334, 335, 344, 346
Белки пенициллинсвязывающие 283—240
— химерные, идентификация 245—246
Бесклеточные прокариотические системы, использование в качестве матриц ДНК плазмид или фага λ 234—240
— — — — — — — — линейных ДНК 241—243
— — — сравнение систем in vivo и in vitro 187, 251
— экстракты из целых клеток, выделение РНК 93—94
— — — — — картирование РНК-транскриптов с помощью нуклеазы S1 99—101
— — — — — кэпирование 105
— — — — — метилирование 105
— — — — — ограничения метода прерванной транскрипции 98—99
— — — — — определение транскрипционной активности РНК-полимераз 96—98
— — — — — полиаденилирование 105—108
— — — — — прерванная транскрипция 94—98
— — — — — приготовление 90—92
— — — — — процессинг предшественников мРНК 105—108
— — — — — — — рРНК 90, 109
— — — — — — — тРНК 90, 109
— — — — — реакционная смесь для проведения транскрипции 92—93
— — — — — сплайсинг мРНК 105
— — — — — транскрипция при участии РНК-полимеразы II, оптимизация активности фермента 101—105

Вирус мышиной саркомы Молони (MoMuSV) 40, 52—55
— обезьяний 40 (SV40) 24, 25, 30, 39, 41, 44, 369
— опухоли молочной железы мышей (MMTV) 57
— полиомы 24, 32
— простого герпеса типа 1 (HSV-1) 10, 12, 29, 34—38, 45, 49—61
— энцефаломиокардита 268—270
Вирусы, выделение из них РНК 268—270
— как векторные системы для трансфекции *см.* Трансфекция

Гель-электрофорез двумерный 354, 356
Гемин как фактор, предотвращающий активацию репрессора трансляции 280, 286, 300—301, 319—320
— оптимизация белоксинтезирующей активности лизата ретикулоцитов 280—281

— приготовление исходного раствора 280
Гены антигенов тканевой совместимости 61
— белков теплового шока 61
— глобиновые 58—61, 85, 172—173, 176—178
— действие на их активность глюкокортикоидов 57
— иммуноглобулиновые 61
— индуцибельные 55—61
— металлотионеиновые 56—57
— рибосомной РНК 67—68
Гепарин как ингибитор РНКазы 274
Гепарин-сефароза 165
Гибридизация, анализ прерванных РНК-транскриптов 94—96, 98—101, 136—147
— — РНК-транскриптов методом норсерн-блоттинг 77, 79—81
— — — — элюции гибридов 77
— идентификация 5′-концов РНК-транскриптов методом наращивания затравки 84
— использование нуклеазы S1 *см.* Нуклеаза S1 и Картирование
— количественная оценка специфических РНК-транскриптов 37, 138—142, 171—173
— меченой ДНК с иммобилизованной РНК (спот-гибридизация) 37
— — РНК с иммобилизованной ДНК (дот-гибридизация) 139—141
— определение размеров специфических РНК-транскриптов 142—144
— элюция гибридизовавшейся РНК 143
Гипоксантин-гуанин—фосфорибозилтрансфераза (HGPRT) 38
Гистоны, реконструкция хроматина из диссоциированных компонентов 182, 184
Глиоксаль, применение для денатурации РНК 94, 95, 98, 101, 125
Голда и *Швейгера*, бесклеточная система 230—234
Гуанидиний, использование его солей при выделении РНК 123, 260—261

Дигидрофолатредуктаза (DHFR) 41
Диэтилпирокарбонат (ДЭПК) 217—218, 255, 256
ДНК, введение радиоактивной метки 174—176
— вирусов эукариот, упаковка in vitro 32
— выделение из папилломавируса быка по методу Хирта 46
— высокомолекулярная хромосомная, выделение 16
— геномная, использование при трансформации 18
— микроинъекция в клетки млекопитающих методом «прокалывания» 28—29
— — — — — с помощью микропипетки 26—28
— — — ооциты *Xenopus*, анализ РНК-транскриптов, картирование 3′-концов 84
— — — — — — — — 5′-концов 79
— — — — — — — — с помощью нуклеазы S1 79, 81—82
— — — — — — — — — — наращивания затравки 84
— — — — — выделение РНК после инъекции 75—76
— — — — — идентификация РНК-полимераз 84—85
— — — — — исследование регуляторных белков 87
— — — — — — сопряженной транскрипции—трансляции 86—87
— — — — — конформация, стабильность и концентрация инъецированной ДНК 69—70

— — — — — метод центрифугирования 72—74
— — — — — мечение белков, кодируемых инъецированной ДНК 75
— — — — — — РНК-транскриптов 74—75
— — — — — определение сайтов инициации транскрипции 79—84
— — — — — — — терминации транскрипции 85
— — — — — основное оборудование 68—69
— — — — — получение ооцитов 68
— — — — — посттранскрипционный процессинг 85
— — — — — «слепой» метод 70—73
— — — — — сплайсинг РНК 68, 85
— очистка имеющихся в продаже препаратов 18—19
— разделение цепей 174, 176
— рекомбинантная плазмидная, выделение 17—18, 46, 201, 223—224
— сверхспиральная 98, 244—245
— удаление из препаратов РНК 99
— фаговая, выделение 235
— электрофорез в полиакриламидном геле 176
ДНКаза, определение активности 116
— I, применение при выделении РНК 123
ДНК-целлюлоза 165
ДЭАЭ-декстрановый метод трансфекции клеток млекопитающих 24—26

Зьюби, выделение плазмидной ДНК 223—224
— — — — оборудование и реактивы 217—218
— — — — оптимальные концентрации ионов магния и S30-экстракта 224—229
— — — — получение S30-экстракта 221—223

Иммунопреципитация продуктов трансляции эукариотической мРНК в бесклеточных экстрактах 303, 305
— — — — — — ооцитах *Xenopus* 352—353

Кальцийфосфатная методика трансфекции клеток млекопитающих, абсорбция копреципитата ДНК—фосфат кальция 20
— — — — — время предселективной экспрессии 20—21
— — — — — ДНК-носитель 12, 18—19.
— — — — — донорная ДНК 16
— — — — — котрансформация 23—24
— — — — — кривые «доза — ответ» 21—22
— — — — — основная процедура 11—16
— — — — — отбор на метоцеле 15
— — — — — реципиентные клетки 19
— — — — — «усилители» экспрессии 22—23
Картирование 3′-концов РНК-транскриптов с помощью нуклеазы S1 84. *См. также* Нуклеаза S1
— — — — — РНКазы T1 144—147
— 5′-концов РНК-транскриптов методом наращивания затравки 84
— — — — «отпечатков пальцев» 99
— — — с помощью нуклеазы S1 60—61, 79, 81—82, 174—179. *См. также* Нуклеаза S1
— — — — — прерванной транскрипции 94—99
— — — — — РНКазы T1 144—147
— сайтов инициации транскрипции *см.* Картирование 5′-концов РНК-транскриптов

Колифаг M13mp7 371
— id 371
Ксантин-гуанин—фосфорибозилтрансфераза (XGPRT) 40

β-Лактамаза 29, 235—236
Липосомы как переносчики генов 29—31
Луриа агар 189

Матричная РНК (мРНК), выбор метода выделения 257
— — выделение из вирусов 268—270
— — — — полисом 262—268
— — — — целых клеток или цитоплазматических фракций 257—262
— — — методом селективной гибридизации 274
— — — poly(A)$^-$-мРНК 273—274
— — защита от загрязнения РНКазой 254, 255, 272—274
— — использование растворов LiCl и мочевины 262
— — кэпирование 84, 105, 131—136, 155—156
— — метод «смещения равновесия» 318
— — микроинъекция в ооциты *Xenopus*, биологические тесты для выявления синтезированных белков 331, 344
— — — — — — выбор радиоактивных предшественников для введения метки 346—348
— — — — — — двумерный гель-электрофорез 354—356
— — — — — — извлечение яичника из лягушки 334
— — — — — — иммунопреципитация 352—353
— — — — — — ингибирование трансляции 358—359
— — — — — — компартментация и секреция чужеродных белков 330
— — — — — — культивирование ооцитов после инъекции 346
— — — — — — необходимое оборудование 336—340
— — — — — — подбор концентрации РНК 343—344
— — — — — — подготовка ооцитов к инъекции 334—336
— — — — — — посттрансляционная модификация белков 329, 331, 358, 360
— — — — — — процедура введения метки 349
— — — — — — сравнение с бесклеточными системами 327—331
— — — — — — стабильность инъецированных мРНК 343
— — — — — — субклеточное фракционирование ооцитов 350—352
— — — — — — трансляция инъецированных мРНК 327—329
— — — — — — электрофорез в ПААГ—ДСН без восстановления 353—354
— — — — — — — — — — в восстанавливающих условиях 353
— — — — — — энуклеация ооцитов 356—358
— — очистка poly(A)$^+$-мРНК аффинной хроматографией на oligo(dT)-целлюлозе 271—272
— — — — — — — poly(U)-сефарозе 151—153, 272—273
— — — — гель-электрофорезом 270—271
— — — — связыванием с немодифицированной целлюлозой и фильтрами типа Millipore 273
— — — — фенольной экстракцией при нейтральном pH 273
— — — — центрифугированием в градиенте плотности сахарозы 270
— — процессинг предшественников

см. Процессинг посттранскрипционный
— — трансляция *см.* Трансляция
Мембранные везикулы из *E. coli*, получение и использование 237, 239, 240
Мембраны микросомные, выделение из поджелудочной железы собаки 309—311
Метоцель, отбор трансформированных клеток 15—16
Модификации посттрансляционные в ооцитах *Xenopus* 329, 331, 358, 360. *См. также* Сигнальные последовательности

Нуклеаза микрококковая, обработка лизата ретикулоцитов 285—287
— — — экстрактов зародышей пшеницы 293
— — — — клеток асцитной опухоли Эрлиха 299
— S1, картирование 3′-концов РНК-транскриптов 84
— — — 5′-концов РНК-транскриптов с использованием радиоактивной ДНК 59—60, 79—81, 174—180
— — — — — — — — РНК 99—101
— — — сайтов инициации транскрипции 173—180
— — количественное определение специфических РНК-транскриптов 99—101, 169—172
— — удаление неспецифической РНК 99
Нуклеазы *см.* ДНКаза, РНКаза, Нуклеаза S1
Нуклеосомы 184
Нуклеотиды меркурированные, использование при выделении РНК-транскриптов 137—138, 166—169

2′,5′-Олигоаденилаты как ингибиторы белкового синтеза 3, 19

Oligo(dT)-целлюлоза, очистка мРНК 271—272
Онкогены 43

Папилломавирус (BPV) 46—48
Паповавирус 33
Плазмида pACYC184 188
— pAG60 39
— pAT153, 223, 365
— pBPV1-D1 45
— pBpV-H1 45
— pBPV-*tk* 45
— pBR322 101, 210, 226, 365
— pBR325 223, 234, 235, 245, 249
— pBS42 188
— pKN410 247
— pLG281 235
— pLG517 188
— pMX 176, 177
— pSC101 200
— pSV2-*cat* 39
— pSV2-*dhfr* 39
— pSV2-*gpt* 39
— pTK1 12, 52—55
— pTK10 52
— pTKBV1-201 54
— pTKBX9 54
— pTKε1 52
— pTKHβG-1 59, 60
— pTK1MOE1 54
— pTKMOLTR1 52
— pTK1SV1 54
Поливинилсульфат как ингибитор РНКазы 274
Полисомы, выделение мРНК 268
— иммунопреципитация 266—267
— получение методом высокоскоростного центрифугирования 262—263
— — осаждением солями магния 264
— связанные и свободные, разделение 265—266
— фракционирование по размерам 266
— центрифугирование в градиенте

плотности сахарозы 262—267, 319
Предшественники белков *см.* Модификации посттрансляционные, Сигнальные последовательности
Протеаза, определение активности 117
— предохранение белков от ее воздействия 115, 214
Протопласты, слияние для переноса генов 31
Процессинг посттранскрипционный предшественников мРНК, кэпирование 84, 105, 131—136, 155—156
— — — — метилирование 105, 154—155
— — — — полиаденилирование 105—108, 151—154
— — — — сплайсинг 85, 105, 156
— — — рРНК 156
— — — тРНК 156

Регуляторные белки в ооцитах *Xenopus*, определение 87
— факторы в ядрах, определение 157
Репрессор трансляции эукариотической мРНК в лизате ретикулоцитов 280, 286, 318
Рибонуклеозидтрифосфаты меркурированные, использование для выделения РНК-транскриптов 168
РНК, выделение из клеток млекопитающих 36. *См. также* Матричная РНК (мРНК)
— — — ооцитов *Xenopus* после инъекции 75—76
— — — экстракта клеток HeLa 93—94
— — — ядер 123
— выход из ядер 156—157
— изучение структуры 5′-конца методом «отпечатков пальцев» 99
— количественное определение 37, 121, 123, 138—142, 171—173
— метилирование 105, 154—155
— определение размеров 79, 80—81, 95—96, 101, 124—125, 142—144, 270
— полиаденилирование 151—154
— полиаденилированная, выделение 151—153, 271—274. *См. также* Матричная РНК (мРНК)
— — определение длины poly(A)-последовательностей 152—154
— процессинг *см.* Процессинг посттранскрипционный
— фракционирование с помощью гель-электрофореза 100, 125, 270—271
— — — — центрифугирования в градиенте плотности сахарозы 124, 270—271
— электрофорез в ПААГ 125, 270
РНКаза, защита от ее действия 115—117, 217—218, 255—257, 260, 262, 274—275
— определение активности 116
— T1, картирование концов РНК-транскриптов 144—147
— — расщепление РНК 126, 142—146
РНК-зависимая транскрипция 180
РНК-полимераза *E. coli*, выделение 162—164
— — транскрипция хроматина *см.* Хроматин
РНК-транскрипты, анализ с помощью гель-электрофореза 77
— количественная оценка с помощью дот-гибридизации 138—142
Ртуть-агароза, использование при выделении РНК-транскриптов 128—129
— получение 129—130
Ртуть-целлюлоза, использование при выделении РНК-транскриптов 128—130
— получение 130

Сайты рестрикции, идентификации с помощью систем транскрипции—трансляции in vitro 249
Сверхспирализация, стимуляция транскрипции 244—245
Сефароза с ковалентно пришитым белком А, использование при иммунопреципитации продуктов трансляции 305, 306
— тиолированная, использование для выделения РНК-транскриптов 166—169
Сигнальные последовательности, выделение микросомных мембран 309
— — изучение с помощью мембранных везикул 237, 239—240
— — отщепление при переносе белков через мембраны 311—313
— — сравнение продуктов белкового синтеза in vivo и in vitro 237—240
— — узнавание с помощью специфического белка 312
Синтез белков, определение включившейся радиоактивности 225—229, 283—285
— РНК, количественное определение 121—123, 169—173
Сплайсинг 68, 85, 105, 156

Тимидинкиназа (ТК), определение активности 34
— отбор *tk*-трансформантов 12—16, 33—35
— тест на наличие мРНК 35, 37
— транскрипция гена 10—24
Тионуклеозидтрифосфаты, исследование РНК-транскриптов 126—131, 138, 150—151
Транскрипция в бесклеточных экстрактах при участии РНК-полимеразы I 89—90, 108—109
— — — — — — РНК-полимеразы II 89—99, 101—105
— — — — — — РНК-полимеразы III 89—90, 109
— — ооцитах *Xenopus* при участии РНК-полимеразы I 67—68, 84—85
— — — — — — РНК-полимеразы II 65—67, 77—85
— — трансфицированных клетках при участии РНК-полимеразы II 10—61
— — хроматине при участии РНК-полимеразы II 118, 161, 164
— — ядрах при участии РНК-полимеразы I 119, 121, 123
— — — — — РНК-полимеразы II 119—123
— идентификация РНК-полимераз 84—85, 97—98, 119, 121—123
— инициация синтеза РНК 127—136
— количественное определение 37, 121—123, 138—142, 169—173
— — — РНК-транскриптов 37, 121, 123, 138—142, 171—173
— определение концов РНК-транскриптов *см.* Картирование
— — размеров РНК-транскриптов 79—81, 95—96, 101, 124—125, 142, 144, 270
— — сайтов инициации 60—61, 79, 81, 83—84, 94—101, 144—147, 173—180. *См.* Картирование
— прерванная 94—99
— регуляторные последовательности 52
— — факторы 87, 157
— сайты терминации 85
— системы *см.* Бесклеточные прокариотические системы, Трансфекция, Хроматин, Экспрессия генов in vivo, Ядра
— скорость элонгации 96, 125—127, 147—149
Транскрипция—трансляция в ооцитах *Xenopus* 86—87
— — достоинства и недостатки системы in vitro 250, 251—252

— — сравнение систем in vitro с системами in vivo 251
— — у прокариот 216—252. *См. также* Бесклеточные прокариотические системы
Трансляция эукариотической мРНК в бесклеточных фракционированных системах 299
— — — — лизате ретикулоцитов, включение аминокислот 283—285, 287
— — — — — — достоинства и недостатки системы 288—290
— — — — — — обработка микрококковой нуклеазой 285—287
— — — — — — оптимизация белоксинтезирующей активности 280—281
— — — — — — приготовление и хранение лизата 277—280
— — — — — — регуляция, ингибиторы белкового синтеза 318—320
— — — — — — — механизм действия ингибиторов 318—320
— — — — — — — образование комплексов инициации 314—318
— — — — — — трансляция экзогенных мРНК 281—283, 287—288, 301—302
— — — — — — эндогенных мРНК 281, 287, 302
— — — — — условия инкубации 281—285, 287—288
— — — — ооцитах *Xenopus см.* Матричная РНК (мРНК), микроинъекции в ооциты *Xenopus*
— — — — экстрактах зародышей пшеницы, обработка микрококковой нуклеазой 293
— — — — — — — преимущества и недостатки системы 293—294
— — — — — — — приготовление и хранение экстрактов 290—291
— — — — — — — условия инкубации 291—293
— — — — — культур клеток, достоинства и недостатки системы 299—301
— — — — — — — обработка микрококковой нуклеазой 299
— — — — — — — оптимизация условий инкубации 297—298
— — — — — — — предынкубация клеточных экстрактов 296
— — — — — — — приготовление экстрактов 295—296
— — — — — — — и тканей, образование комплексов инициации 320—322
— — — продукты трансляции, анализ с помощью электрофореза в ПААГ—ДСН 302—303
— — — — — — триптических пептидов 305—308
— — — — биологическая активность в бесклеточных экстрактах 308
— — — — — — — ооцитах *Xenopus* 331
— — — — включение аминокислот 301—302
— — — — иммунопреципитация 303, 305
— — — — расшифровка аминокислотных последовательностей 308
— — — процессинг, протеолиз первичных продуктов 313—314
— — — — сигнальные последовательности *см.* Сигнальные последовательности
Транспортные РНК (тРНК), использование N-формил-[^{35}S]-метионил-тРНК$_f$ для изучения процессинга продуктов трансляции 313, 316
— — получение [^{35}S]-Met-тРНК 315—316. *См. также* Процессинг посттранскрипционный
Трансфекция клеток млекопитающих, векторы на основе вирусов 43—48

— — — выбор метода переноса генов 32—33
— — — ДЭАЭ-декстрановый метод 24—26
— — — индуцибельные гены 55—61
— — — использование электростимуляции 32
— — — кальцийфосфатная методика *см.* Кальцийфосфатная методика трансфекции клеток млекопитающих
— — — липосомы как переносчики генов 29—31
— — — метод отбора колоний на метоцеле 15
— — — микроинъекция ДНК *см.* ДНК
— — — перенос генов с помощью хромосом 32
— — — последовательности ДНК, регулирующие транскрипцию 52—55
— — — селектируемые маркеры, аминогликозид — фосфотрансфераза (APH) 38
— — — — — гипоксантин-гуанин—фосфорибозилтрансфераза (HGPRT) 38
— — — — — дигидрофолатредуктаза (DHFR) 41—42
— — — — — доминантные трансформирующие гены 42—43
— — — — — ксантин-гуанин—фосфорибозилтрансфераза (XGPRT) 40—41
— — — — — онкогены 43
— — — — — тимидинкиназа 33—34
— — — — — хлорамфеникол-ацетилтрансфераза (CAT) 39—40
— — — слияние протопластов с эукариотическими клетками в культуре 31
— — — стабильная трансформация 50—52
— — — упаковка in vitro ДНК вирусов эукариот 32
— — — фаза временной экспрессии перенесенных генов 48—50
— — — экспрессия генов, чувствительных к глюкокортикоидам 57
— — — — глобиновых генов 59—61
— — — — металлотионеиновых генов 56—57
— — — — *tk*-гена HSV 48—55
Трансформация *см.* Трансфекция
Трикаин (MS 222) 333. *См. также* Этил-*м*-аминобензоат
«Триптиказный» агар 189
Трихлоруксусная кислота (ТХУ), применение при изучении синтеза белков 225—228, 284—285
— — — — — транскрипции 120—121

Фаг, использование в системе миниклеток 208
— — — — УФ-облученных клеток-хозяев 186—187, 192
— — при трансфекции клеток млекопитающих 18
— концентрирование препаратов 194
— осаждение в полиэтиленгликоле (ПЭГ) 194. 195
— получение 193—195
— титрование 193, 194
Фенол, использование при выделении РНК 123, 257—260
— перегонка 256—257
Флюорография геля 197, 198

Хлорамфеникол-ацетилтрансфераза (CAT) 39—40, 234—236
Хроматин, анализ специфических РНК-транскриптов гибридизацией с ДНК-зондами 169—173
— — — — картирование с помощью нуклеазы S1 173—180
— выделение гистонов методом солевой экстракции 181

— — — — — хроматографии на гидроксиапатите 181
— — негистоновых белков методом дифференциального экстрагирования 181
— — — — — — хроматографии на гидроксиапатите 181
— — РНК-полимеразы *E. coli* 162—165
— обоснованность применения РНК-полимеразы *E. coli* 164, 180—181
— принципы методов выделения 160—161
— проблемы, связанные с наличием эндогенной РНК 165—167
— реконструкция 182—184
— сохранение эндогенной РНК-полимеразной активности 118
— транскрипция ДНК-зависимая РНК-полимеразой *E. coli* 167—169
— — РНК-зависимая РНК-полимеразой *E. coli* 180
— — эндогенной РНК-полимеразой 118—121
— фракционирование 181—182

Центрифугирование в градиенте плотности сахарозы гомогенизированных ооцитов 350—352
— — — — — комплексов инициации трансляции 321—322
— — — — — метод «подушки» 352
— — — — — — «ступенчатый» 352
— — — — — микросомных мембран 310
— — — — — мини-клеток 201—204
— — — — — РНК 124, 270—271
— — — — CsCl, метод самоформирующегося градиента 194

Штаммы *E. coli* с низкой РНКазной активностью или без нее 240

Экзонуклеаза V в клетках *E. coli* 241—242

Экспрессия генов в бесклеточных прокариотических системах транскрипции—трансляции 240
— — in vivo в прокариотических системах, соответствие между генами и их продуктами 213—214
— — — — — — — макси-клеток, введение радиоактивной метки в кодируемые плазмидой белки 209, 212
— — — — — — — — возможные проблемы 212—213
— — — — — — — — выбор бактериального штамма 208—210
— — — — — — — подходящие плазмиды 210
— — — — — — — получение макси-клеток 210—211
— — — — — — — принцип метода 186, 208
— — — — — — — сравнение с другими системами in vivo и in vitro 187
— — — — — — — мини-клеток, введение радиоактивной метки 205
— — — — — — — возможные проблемы 206—207
— — — — — — — заражение мини-клеток бактериофагами 208
— — — — — — — подходящие плазмиды 200
— — — — — — — полипептиды — предшественники белков 207—208
— — — — — — — получение и очистка мини-клеток 201—204
— — — — — — — принцип метода 186, 199—200
— — — — — — — сравнение с другими системами in vivo и in vitro 187

— — — — — — — — — трансформация хозяина — продуцента мини-клеток 200—202
— — — — — — — — — фракционирование мини-клеток 207
— — — — — — — — — штамм-хозяин *E. coli* 410, 200
— — — — — — — — УФ-облученных клеток-хозяев, введение радиоактивной метки в кодируемые фагом белки 195—197
— — — — — — — — — возможные проблемы 197—198
— — — — — — — — — использование фагов с гибридным иммунитетом 199
— — — — — — — — концентрирование препаратов фага 194
— — — — — — — — необходимые материалы и штаммы 192
— — — — — — — — получение фага 193—195
— — — — — — — — принцип метода 186, 190, 192
— — — — — — — — — сравнение с другими системами in vivo и in vitro 187
— эукариотических генов в клетках *E. coli* 249—250
— — — — системах in vitro 250

Электрофорез в агарозном геле 55, 59, 79, 95—97, 101, 125, 270—271
— — полиакриламидном геле в присутствии ДСН (ПААГ — ДСН) 197,209, 214, 227—229, 234, 238, 248, 301—303, 313, 353—354
Элонгация при транскрипции 96, 125—127, 147—149. *См. также* Транскрипция
Энуклеация ооцитов 356—358
Энхансеры 52—55
Этил-*м*-аминобензоат 333. *См. также* Трикаин

Ядра, анализ суммарных РНК-продуктов 124—125
— выделение без использования детергентов 117—118
— — из клеток культуры ткани 112—115
— — — целых тканей 115
— — и изучение первичных РНК-транскриптов 149—151
— — с помощью неводных методов 118
— защита от нуклеаз и протеаз при выделении 115—117
— инициация синтеза РНК, использование [γ-^{32}P]-нуклеозидтрифосфатов 127—129
— — — — — β-тионуклеозидтрифосфатов 130—131
— — — — — γ-тионуклеозидтрифосфатов 128—130
— — — — кэпирование 131—136, 155—156
— как система для изучения транскрипции, преимущества и недостатки 111—112
— количественная оценка специфических РНК-транскриптов 138—142
— определение активности РНК-полимераз 121—123
— — концов РНК-транскриптов 144—147
— — размеров РНК-транскриптов 124, 142—144
— — регуляторных факторов, участвующих в транскрипции 157
— очистка специфических РНК-транскриптов 136—138
— процессинг предшественников мРНК, метилирование 154—155
— — — — полиаденилирование 151—154
— — — рРНК 156
— — — тРНК 156

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие редактора перевода 5

Предисловие . . 7

Введение *Дж. Гердон* 8

Глава 1. Экспрессия экзогенной ДНК в клетках млекопитающих. *Д. Спандидос, Н. Уилки* 10

1. Введение 10
2. Методы введения ДНК в клетки млекопитающих 11
   2.1. Кальций-фосфатная методика трансфекции 11
   2.2. ДЭАЭ-декстрановый метод 24
   2.3. Микроинъекция 26
   2.4. Липосомы как переносчики генов 29
   2.5. Слияние протопластов 31
   2.6. Другие методы переноса генов 32
   2.7. Выбор метода переноса генов 32
3. Селектируемые маркеры 33
   3.1. Биохимические маркеры 33
   3.2. Доминантные трансформирующие гены, изменяющие регуляцию роста 42
4. Векторы на основе вирусов 43
   4.1. Векторные системы на основе литических вирусов 44
   4.2. Векторные системы на основе ретровирусов 44
   4.3. Векторы на основе папилломавирусов 45
5. Экспрессия перенесенных генов 48
   5.1. Временная экспрессия 48
   5.2. Стабильная трансформация 50
   5.3. Изучение последовательностей, регулирующих транскрипцию 52
   5.4. Индуцибельные гены 55
   Благодарности 61
   Литература 61

Глава 2. Экспрессия экзогенной ДНК в ооцитах *Хепорис. А. Колмен* 65

1. Введение 65
2. Получение ооцитов и подготовка их к микроинъекции 68
3. Микроинъекция ДНК в ядра ооцитов 68
   3.1. Необходимое оборудование 68
   3.2. Конформация ДНК, используемой для инъекции 69
   3.3. Стабильность инъецированной ДНК 69
   3.4. Концентрация ДНК, используемая для инъекции 69
   3.5. Заполнение микропипеток раствором ДНК 70
   3.6. Микроинъекция 70
4. Радиоактивное мечение ооцитов после инъекции 74
   4.1. Мечение РНК, транскрибированной на инъецированной ДНК 74

4.2. Мечение белков, кодируемых инъецируемой ДНК . . . 75
5. Анализ РНК-транскриптов 75
5.1. Выделение РНК 75
5.2. Характеристика РНК-транскриптов 77
5.3. Идентификация РНК-полимераз, участвующих в транскрипции 84
6. Анализ посттранскрипционного процессинга 85
7. Использование системы ооцитов для исследований сопряженной транскрипции — трансляции 86
8. Исследование регуляторных белков 87
Литература 87

Глава 3. Транскрипция генов эукариот в бесклеточных экстрактах. *Дж. Мэнли* 89

1. Введение 89
2. Получение и использование бесклеточного экстракта для транскрипции РНК-полимеразой II 90
2.1. Получение экстракта 90
2.2. Реакция транскрипции 92
2.3. Выделение РНК 93
3. Анализ продуктов транскрипции РНК-полимеразой II . . . 94
3.1. Эксперименты с прерванной транскрипцией 94
3.2. Ограничения 98
3.3. Анализ с помощью гибридизации и расщепления нуклеазой S1 99
4. Оптимизация транскрипционной активности РНК-полимеразы II 101
4.1. Подбор концентраций ДНК и экстракта 101
4.2. Различия между экстрактами 103
4.3. Условия реакции 104
5. Посттранскрипционный процессинг молекул — предшественников мРНК 105
5.1. Кэпирование и метилирование 105
5.2. Сплайсинг 105
5.3. Полиаденилирование 105
6. Транскрипция в бесклеточных экстрактах при участии РНК-полимераз I и III 108
Благодарности 109
Литература 109

Глава 4. Транскрипция РНК в изолированных ядрах. *У. Марзлаф и Р. Хуан* 111

1. Введение 111
2. Выделение ядер 112
2.1. Введение 112
2.2 Основной метод 113
2.3. Меры защиты от нуклеаз и протеаз 115
2.4. Варианты метода выделения ядер 117
2.5. Выделение хроматина с эндогенной РНК-полимеразной активностью 118
3. Синтез РНК в изолированных ядрах 119
3.1. Условия синтеза РНК 119
3.2. Определение активности различных РНК-полимераз . . 121
3.3. Выделение РНК 123
4. Общий анализ синтеза РНК 124
4.1. Анализ суммарных РНК-продуктов 124
4.2. Скорость элонгации 125
4.3. Инициация синтеза РНК 127
5. Анализ специфических РНК-транскриптов 136
5.1. Очистка РНК-транскриптов 136

5.2. Количественная оценка специфических РНК-транскриптов . 138
5.3. Определение размеров специфических РНК-транскриптов 142
5.4. Определение концов РНК-транскриптов 145
6. Применение систем ядерной транскрипции 147
6.1. Измерение относительной скорости транскрипции гена . . 147
6.2. Что такое первичный транскрипт 149
6.3. Выделение и изучение первичных транскриптов . . . 150
6.4. Изучение посттранскрипционных модификаций . . . 151
6.5. Изучение ядерного транспорта зрелой РНК 156
6.6. Изучение регуляторных факторов 157
Благодарности 157
Литература 157

Глава 5. Транскрипция хроматина. *С. Гилмор* 160

1. Введение 160
2. Выделение хроматина 160
3. Источник РНК-полимеразы 161
4. Оптимальные условия транскрипции in vitro 165
4.1. Проблемы, связанные с эндогенной РНК . . . 165
4.2. ДНК-зависимая транскрипция хроматина 167
5. Анализ РНК-транскриптов 169
5.1. Гибридизация со специфическими ДНК-зондами . . . 169
5.2. Картирование сайтов инициации транскрипции с помощью нуклеазы S1 173
6. Обоснованность применения РНК-полимеразы *E. coli* . . 180
7. Фракционирование и реконструкция хроматина 181
7.1. Фракционирование хроматина 181
7.2. Реконструкция хроматина 182
7.3. Точность реконструкции 183
Литература 184

Глава 6. Прокариотические системы экспрессии генов in vivo. *Н. Стоукер, Дж. Пратт, Б. Холланд* 186

1. Введение 186
2. Система клеток-хозяев, облученных УФ-светом 190
2.1. Введение 190
2.2. Материалы и штаммы 192
2.3. Штамм бактерий-хозяев 192
2.4. Получение фага 194
2.5. Методика введения метки в кодируемые фагом белки . . 195
2.6. Возможные проблемы 197
2.7. Использование нелизогенного хозяина 198
2.8. Использование фагов с другими областями иммунности 198
3. Система мини-клеток 199
3.1. Введение 199
3.2. Материалы и штаммы 200
3.3. Штамм *Escherichia coli* DS410 — продуцент мини-клеток . 200
3.4. Подходящие плазмиды 200
3.5. Получение мини-клеток 201
3.6. Мечение белков, кодируемых плазмидой 205
3.7. Возможные проблемы 206
3.8. Фракционирование мини-клеток 207
3.9. Появление полипептидов-предшественников 207
3.10. Заражение мини-клеток бактериофагами 208
4. Система макси-клеток 208

4.1. Введение 208
4.2. Выбор штамма бактерий для получения макси-клеток . . 208
4.3. Подходящие плазмиды 210
4.4. Получение макси-клеток 210
4.5. Возможные проблемы 212
5. Соответствие между генами и их продуктами 213
Благодарности 214
Литература 214

Глава 7. Сопряженные прокариотические бесклеточные системы транскрипции — трансляции. *Дж. Пратт* 216

1. Введение 216
2. Получение бесклеточной системы Зьюби 216
2.1. Введение 216
2.2. Оборудование и реактивы 217
2.3. Получение клеток 218
2.4. Получение S30-экстракта 221
2.5. Оптимизация системы 223
3. Получение бесклеточной системы Голда и Швейгера . . 230
3.1. Введение 230
3.2. Оборудование и реактивы 230
3.3. Получение клеток 230
3.4. Получение бесклеточного экстракта 232
3.5. Оптимизация системы 233
3.6. Модификация основной методики 234
4. Использование в качестве матриц ДНК плазмид или фага λ 234
4.1. Экспериментальные подходы 234
4.2. Идентификация продуктов клонированных генов . . . 234
4.3. Идентификация предшественников белков 237
4.4. Исследования регуляции экспрессии генов 240
5. Использование линейных ДНК в качестве матриц 241
5.1. Экспериментальный подход 241
5.2. Значение сверхспирилизации 244
5.3. Идентификация химерных белков 245
5.4. Идентификация продуктов клонированных генов, сходных по размеру с белками, кодируемыми вектором 246
5.5. Идентификация генов, клонированных со своими собственными промоторами 248
5.6. Идентификация сайтов рестрикции внутри генов и между генами 249
5.7. Анализ ДНК в гетерологичных системах 249
5.8. Экспрессия эукариотических генов 249
6. Сравнение систем транскрипции — трансляции in vitro . . 250
6.1. Достоинства и недостатки модифицированной системы Зьюби 250
6.2. Достоинства и недостатки системы Голда и Швейгера . . 250
7. Преимущества системы in vitro по сравнению с системами in vivo 251
8. Возможные проблемы при использовании систем in vitro . . 251
Благодарности 252
Литература 252

Глава 8. Выделение эукариотической матричной РНК (мРНК). *М. Клеменс* 254

1. Введение 254
2. Выделение и очистка матричной РНК 254
2.1. Оборудование и растворы 255
2.2. Выбор метода выделения РНК 257
2.3. Выделение РНК из целых клеток или цитоплазматических фракций 257

2.4. Выделение полисомной РНК 262
2.5. Выделение вирусной РНК 268
2.6. Фракционирование РНК 270
2.7. Ингибиторы рибонуклеаз 274
Благодарности 275
Литература 275

Глава 9. Трансляция эукариотических матричных РНК в бесклеточных экстрактах. *М. Клеменс* 277

1. Введение 277
2. Лизат ретикулоцитов 277
2.1. Приготовление и хранение лизата 278
2.2. Оптимизация активности 280
2.3. Условия инкубации для синтеза белка 281
2.4. Обработка микрококковой нуклеазой 285
2.5. Достоинства и недостатки 288
3. Экстракты зародышей пшеницы 290
3.1. Приготовлене и хранение экстрактов 290
3.2. Условия инкубации для синтеза белка 291
3.3. Обработка микрококковой нуклеазой 293
3.4. Преимущества и недостатки 293
4. Другие эукариотические бесклеточные системы 294
4.1. Получение экстрактов клеток асцитной опухоли Эрлиха 295
4.2. Предынкубация клеточных экстрактов 296
4.3. Условия инкубации для синтеза белка 296
4.4. Обработка микрококковой нуклеазой 299
4.5. Другие бесклеточные системы 299
4.6. Достоинства и недостатки бесклеточных систем культивируемых клеток 299
5. Анализ продуктов трансляции 301
5.1. Стимуляция включения аминокислот 301
5.2. Электрофорез в ПААГ — ДСН 302
5.3. Иммунопреципитация продуктов трансляции 303
5.4. Анализ триптических пептидов 305
5.5. Расшифровка аминокислотной последовательности . . . 308
5.6. Анализ биологической активности 308
6. Процессинг продуктов трансляции 309
6.1. Сигнальные последовательности 309
6.2. Протеолиз первичных продуктов 313
7. Исследование регуляции трансляции с помощью бесклеточных систем 314
7.1. Лизат ретикулоцитов 314
7.2. Экстракты культур клеток и тканей 320
Благодарности 324
Литература 325

Глава 10. Трансляция эукариотической матричной РНК в ооцитах *Xenopus*. *А. Колмен* 327

1. Введение 327
2. Получение и подготовка ооцитов для микроинъекций . . 331
2.1. Покупка и содержание *Xenopus laevis* 331
2.2. Извлечение ткани яичника из *Xenopus* 332
2.3. Подготовка ооцитов к инъекции 334
3. Микроинъекции мРНК в ооциты 336
3.1. Необходимое оборудование 336
3.2. Изготовление, калибровка и хранение микропипеток . 340
3.3. Микроинъекции матричной РНК 343

4. Культивирование ооцитов после инъекции и введение в них радиоактивной метки 346
4.1. Среда для культивирования 346
4.2. Выбор радиоактивных аминокислот 346
4.3. Другие радиоактивные предшественники 348
4.4. Выбор времени мечения 348
4.5. Процедура мечения ооцитов 349
5. Сбор, фракционирование и анализ ооцитов и инкубационной среды после культивирования 349
5.1. Разделение ооцитов и инкубационной среды после инкубации 350
5.2. Гомогенизация ооцитов 350
5.3. Фракционирование ооцитов с помощью центрифугирования в градиенте сахарозы 350
5.4. Обработка инкубационной среды 352
5.5. Иммунопреципитация 352
5.6. Алкилирование и анализ белков с помощью электрофореза в ПААГ — ДСН в восстанавливающих условиях 353
5.7. Частичное алкилирование и анализ в ПААГ — ДСН без восстановления 353
5.8. Двумерный гель-электрофорез 354
6. Специальные методы 356
6.1. Энуклеация ооцитов 356
6.2. Ингибирование трансляции 358
6.3. Ингибирование посттрансляционной модификации . 358
6.4. Эксперименты по защите от протеаз 359
7. Использование системы ооцитов 360
Литература 362

Приложение I. Маркеры молекулярной массы нуклеиновых кислот и полипептидов. *С. Минтер и П. Сили* 365

1. Маркеры ДНК 365
1.1. Плазмида pBR322 365
1.2. Плазмида pAT153 365
1.3. Бактериофаг Лямбда (λ) 365
1.4. Обезьяний вирус 40 (SV40) 369
1.5. Колифаг M13mp7 371
1.6. Бактериофаг φX174 371
1.7. Колифаг fd 371
2. Маркеры РНК 371
3. Маркеры молекулярной массы полипептидов 371
Литература 376

Приложение II. Фирмы — поставщики оборудования и реактивов 378

Список сокращений . . . 381

Список авторов 382

Предметный указатель 383