



ДЕТЕКЦИЯ МАЛЫХ пРНК – ПРОДУКТОВ ТРАНСКРИПЦИИ 6S РНК – С ПОМОЩЬЮ НОЗЕРН-БЛОТ-ГИБРИДИЗАЦИИ В “ЗЕРКАЛЬНОМ” ВАРИАНТЕ

© 2021 г. О. Ю. Буренина*, **, #, Т. С. Орецкая**, Е. А. Кубарева**

*Сколковский институт науки и технологий, Россия, 121205 Москва, ул. Нобеля, 3

**Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1

Поступила в редакцию 30.09.2020 г.

После доработки 10.10.2020 г.

Принята к публикации 13.10.2020 г.

Изучение РНК длиной менее 30 нуклеотидных остатков, в частности микроРНК и других экстремально коротких некодирующих РНК, часто сопряжено с трудностями их детекции не только в условиях *in vivo*, но и *in vitro*. Одной из таких молекул является бактериальная пРНК (от англ. рRNA, “product RNA”), синтезируемая РНК-полимеразой на матрице 6S РНК. Классическим способом идентификации пРНК является нозерн-блот-гибридизация (нозерн-блоттинг) с комплементарными зондами ДНК, содержащими различные метки и модифицированные нуклеозиды. Однако данный способ непригоден для поиска новых пРНК, последовательности которых неизвестны, а также является довольно дорогостоящим и затратным по времени. Мы предложили новый простой метод детекции синтеза пРНК на матрице 6S РНК, так называемый “зеркальный” точечный нозерн-блоттинг. Он не требует проведения гель-электрофореза, а зондом является сама пРНК, образующаяся в процессе транскрипции и содержащая остатки дигоксигенина (DIG). Данный метод позволит осуществлять быстрый скрининг новых 6S РНК или их мутантных вариантов на предмет их способности выступать в качестве матрицы для синтеза пРНК, а также оценивать эффективность данного процесса.

Ключевые слова: 6S РНК, пРНК, нозерн-блоттинг, дигоксигенин

DOI: 10.31857/S0132342321020068

ВВЕДЕНИЕ

6S РНК – обширный класс бактериальных некодирующих РНК (нкРНК) длиной ~200 нт. Несмотря на отсутствие гомологии, все 6S РНК обладают строго консервативной вторичной структурой, идеально повторяющей конформацию промотора ДНК в открытом комплексе с РНК-полимеразой (РНКП) [1]. Благодаря этой особенности 6S РНК может блокировать активный центр фермента, что в масштабе клетки приводит к приостановке процесса транскрипции и, как следствие, экономии ресурсов в неблагоприятных условиях [2]. Интересно, что для “отмены” ингибирования транскрипции существует специальный механизм: РНКП способна синтезировать

короткие транскрипты (пРНК) непосредственно на матрице 6S РНК, что приводит к конформационным изменениям фермент-субстратного комплекса и высвобождению из него РНКП [3]. Этот процесс является своеобразным исключением из правила, поскольку в данном случае ДНК-зависимая РНКП использует для транскрипции РНК-субстрат. На сегодняшний день среди прокариотических нкРНК только 6S РНК обладает такой уникальной особенностью. Таким образом, синтез пРНК является одним из главных критериев, проверяемых при изучении новых молекул – предполагаемых аналогов 6S РНК из различных бактерий [4].

Иногда пРНК могут быть обнаружены при тщательном анализе транскриптомных данных (RNA-Seq) [5], что тем не менее требует последующей экспериментальной проверки. “Классическим” методом детекции РНК является нозерн-блот-гибридизация (нозерн-блоттинг) с комплементарными зондами. Крайне малая длина пРНК (14–30 нт) обуславливает необходимость использования спе-

Сокращения: DIG – дигоксигенин; EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид; NTP – нуклеозидтрифосфат; нкРНК – некодирующая РНК; пРНК – рRNA, “product RNA”, продукт транскрипции с матрицы 6S РНК; РНКП – РНК-полимераза.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 939-54-11; факс: +7 (495) 939-0338; эл. почта: alunit@inbox.ru).

циальных протоколов и модифицированных олигонуклеотидных зондов для повышения чувствительности метода, что, тем не менее, далеко не всегда приводит к положительным результатам. На данный момент всего в трех бактериях удалось обнаружить пРНК в условиях *in vivo* с помощью нозерн-блоттинга: *Escherichia coli* [6], *Bacillus subtilis* [7, 8] и *Rhodobacter sphaeroides* [9]. При этом в клетках *E. coli* и *R. sphaeroides* количество пРНК было достаточным для детекции с помощью ^{32}P -меченных ДНК-зондов, тогда как для *B. subtilis* был разработан специальный протокол с использованием модифицированных ДНК-зондов, содержащих остатки ковалентно-замкнутых нуклеозидов (LNA) и остаток дигоксигенина (DIG). Было показано, что такой способ является гораздо более чувствительным по сравнению с классическим радиоактивным [10]. Тем не менее детектировать 6S-2 пРНК *B. subtilis* (факт синтеза которой в условиях *in vivo* долгое время оставался предметом научных споров) удалось только с помощью еще более усложненного протокола, используя РНК/LNA-зонды с экстремальным количеством модифицированных нуклеозидов и двумя метками DIG на 5'- и 3'-концах молекулы [8].

Детекция пРНК также осложняется особенностями их синтеза, который происходит лишь в определенных, заранее не известных условиях клеточного роста. Например, для *E. coli* активный синтез пРНК был зафиксирован только при резкой смене условий культивирования, когда к клеткам, выращенным на минимальной среде M9, добавляли 10-кратный избыток питательной среды LB, тем самым моделируя “выход” из неблагоприятных условий роста и “снятие” 6S РНК-опосредованного ингибирования транскрипции. При этом максимальная транскрипция пРНК наблюдалась лишь в течение первых 4 мин после смены культуральной среды [6]. Активный синтез 6S-1 пРНК *B. subtilis* также удалось детектировать только в условиях резкого “выхода” из стационарной фазы и только в течение первых 2 мин [7]. В то же время данный протокол не приводил к изменениям в синтезе 6S-2 пРНК *B. subtilis*, и соответствующие транскрипты были обнаружены только в экспоненциальной фазе роста клеток [8]. Уникальная ситуация наблюдалась у бактерии *R. sphaeroides*, в которой удалось детектировать пРНК во всех фазах клеточного роста с весьма незначительной активацией их синтеза в ответ на смену питательной среды, тогда как максимальное количество данных транскриптов приходилось на раннюю экспоненциальную фазу [8]. Однако данный феномен является скорее исключением из правила.

В большинстве случаев для доказательства синтеза пРНК с матрицы 6S РНК проводят эксперименты по транскрипции *in vitro* в присутствии различных ^{32}P -меченных нуклеозидтри-

фосфатов (NTP) с последующим разделением продуктов реакции методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях [11]. Причем для изучения новых 6S РНК, выделенных из редких бактерий, возможно использовать “чужеродные” РНКП, например, РНКП *E. coli* или *B. subtilis*, а также коммерчески доступные ферменты [13]. Как правило, стартовая точка транскрипции располагается в центральном “пузыре” 6S РНК с 3'-конца молекулы (хотя в литературе описано несколько случаев синтеза пРНК с “обратной” стороны “пузыря” [4, 5]), что позволяет предсказать нуклеотидную последовательность образующихся пРНК. Однако интерпретация полученных результатов часто осложняется тем, что в процессе транскрипции образуется набор продуктов разной длины, а визуализация соответствующих сигналов зависит от используемого ^{32}P -меченного NTP и нуклеотидного состава пРНК. Последовательный перебор меченых NTP и их комбинаций, а также условий транскрипции не всегда приводит к положительному результату и пониманию, с какой стороны 6S РНК происходит транскрипция. Поэтому для подтверждения ее специфичности также используют нозерн-блоттинг с зондами, комплементарными пРНК [12, 13].

Ранее мы охарактеризовали две новые 6S РНК из азотфиксирующих бактерий *Bradyrhizobium japonicum* и *Sinorhizobium meliloti* [13]. При исследовании синтеза пРНК в этих бактериях возникли сложности с подбором условий для эффективной транскрипции *in vitro* и, как следствие, трудности с определением стартовой точки и длин пРНК, необходимых для дизайна соответствующих комплементарных зондов для нозерн-блоттинга. Таким образом, актуальной задачей являлся поиск альтернативного способа проверки возможности синтеза пРНК на матрице 6S РНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе для детекции пРНК, образующихся в процессе транскрипции на матрице 6S РНК, был предложен метод “зеркального” нозерн-блоттинга. Основное отличие от “классического” протокола состоит в том, что метка содержится не в зонде, а непосредственно встраивается в пРНК в процессе транскрипции. В нашем случае для этих целей мы использовали коммерчески доступный DIG-11-UTP (Roche, Швейцария). Далее следует гибридизация DIG-меченной пРНК (если она была синтезирована в ходе транскрипции) с “материнской” 6S РНК-мишенью (рис. 1а), иммобилизованной непосредственно на мембране в виде “точек” (dot-blot). Таким образом “зондом” в данном случае выступает сама 6S РНК, не содержащая меток. Последующая детекция DIG с помощью хемолуминесценции является быстрой и безопасной альтернативой ^{32}P -авторадио-

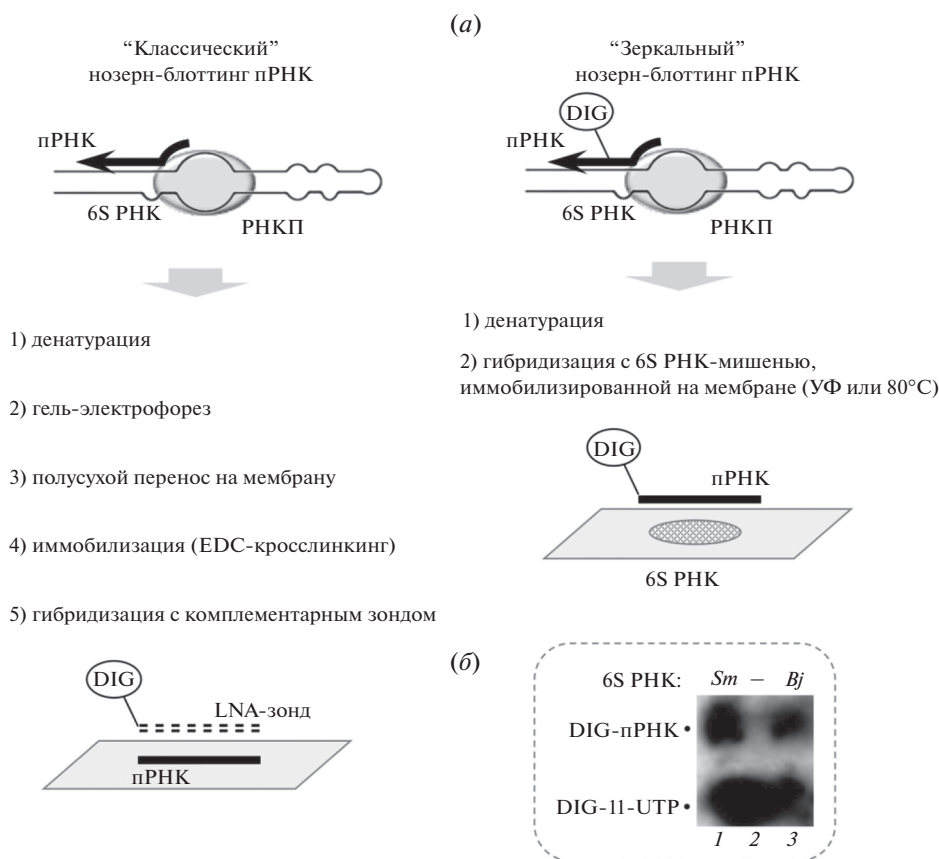


Рис. 1. (а) – Сравнение “классического” и “зеркального” методов детекции пРНК; (б) – анализ продуктов *in vitro* транскрипции с 6S РНК *S. meliloti* (Sm) и *B. japonicum* (Bj) в качестве матрицы для РНКП (дорожки 1 и 3) в присутствии DIG-11-УТР методом геле-электрофореза с последующим переносом *de novo* синтезированных пРНК на мембрану, иммобилизацией в присутствии EDC и непосредственной детекцией DIG с помощью хемоллюминесценции. Дорожка 2 – отрицательный контроль, реакция в отсутствие 6S РНК.

графии [14]. В результате такого эксперимента нельзя определить длину образующихся пРНК и предсказать их нуклеотидную последовательность, но можно быстро установить сам факт синтеза *de novo* транскриптов с матрицы 6S РНК.

Разработанный метод “зеркального” нозерн-блоттинга был верифицирован при анализе синтеза пРНК на 6S РНК из трех бактерий: *B. subtilis*, *S. meliloti* и *B. japonicum*. В реакции использовали “чужеродную” РНКП *E. coli*. Продукты трех *in vitro* транскрипций, проведенных в присутствии DIG-11-УТР, гибридизовали с тремя идентичными мембранами (рис. 2а), на которых были иммобилизованы соответствующие 6S РНК и различные синтетические олигорибонуклеотиды (отрицательные контроли). Для контроля детекции использовали 5'-DIG-меченный олигонуклеотид смешанной ДНК/LNA-природы, использованный ранее в работе Beckmann et al. [12]. Во всех трех случаях были получены специфические сигналы, соответствующие гибридизации пРНК с ее комплементарной 6S РНК-мишенью. Наиболее интенсивный сигнал визуализировался в случае пРНК

B. subtilis (рис. 2б), что согласуется с данными об ее крайне эффективном синтезе с матрицы 6S-1 РНК *B. subtilis* как в условиях *in vitro* [12, 13], так и *in vivo* [8]. В случае пРНК *S. meliloti* и *B. japonicum* аналогичные сигналы характеризовались существенно меньшей интенсивностью, что привело к более высокому уровню фоновых сигналов вплоть до визуализации разметки мембраны и мест иммобилизации РНК (рис. 2в, 2г). Мы также проанализировали продукты *in vitro* транскрипций с 6S РНК *S. meliloti* и *B. japonicum*, проведенных в присутствии DIG-11-УТР, “классическим” способом, включающим разделение продуктов реакции методом геле-электрофореза с последующей иммобилизацией и детекцией на мембране (см. “Эксперим. часть”). Как видно из рис. 1б, в обоих случаях – в присутствии 6S РНК *S. meliloti* и *B. japonicum* (но не в отсутствие 6S РНК) – наблюдали появление сигналов с меньшей электрофоретической подвижностью, которые были интерпретированы нами как DIG-меченные пРНК.

Отметим, что использование DIG-11-УТР в качестве метки является определенным лимити-

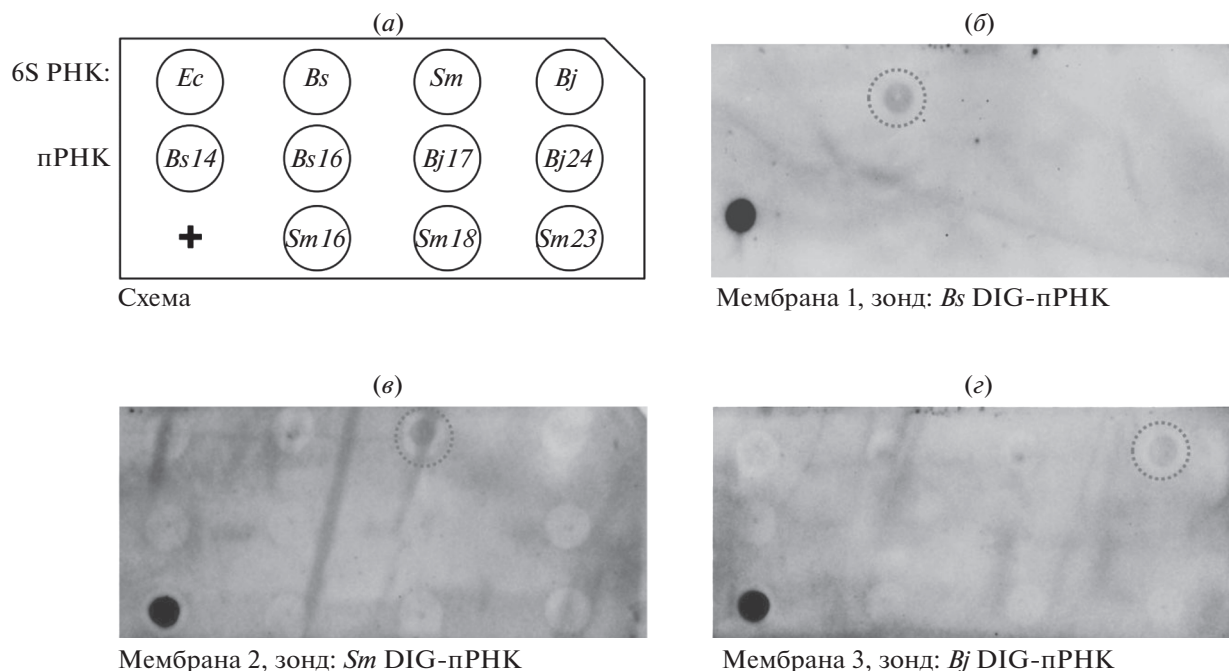


Рис. 2. “Зеркальный” точечный нозерн-блоттинг пРНК *B. subtilis* (*Bs*), *S. meliloti* (*Sm*) и *B. japonicum* (*Bj*). (а) – Схема эксперимента: использовали три одинаковые мембраны, на которые были точно иммобилизованы препараты 6S РНК (1 мкг каждой) и синтетические олигорибонуклеотиды *Bs14*, *Bs16*, *Bj17*, *Bj24*, *Sm16*, *Sm18* и *Sm23* (100 пмоль каждого, отрицательные контроли, см. “Эксперим. часть”); *Ec* – 6S РНК *E. coli*; (+) – положительный контроль детекции (DIG-меченный олигонуклеотид, 10 пмоль). Каждую мембрану гибридизовали с продуктами *in vitro* транскрипции на матрице 6S РНК *B. subtilis* (б), *S. meliloti* (в) или *B. japonicum* (г).

рующим фактором, поскольку может быть применимо только для пРНК, содержащих остатки уридина.

Таким образом, мы впервые предложили новый “альтернативный” метод детекции пРНК с помощью “инвертированного” или “зеркального” нозерн-блоттинга. Главным его преимуществом является отсутствие необходимости подбора и синтеза специфических зондов, поскольку это не всегда возможно (и не всегда необходимо) на начальных этапах исследования и при первичном скрининге различных мутантных 6S РНК или предполагаемых аналогов 6S РНК. Мы полагаем, что подобные эксперименты можно проводить и в радиоактивном варианте при достаточно высокой эффективности синтеза пРНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Подготовка мембран. В данной работе были использованы препараты 6S РНК *S. meliloti*, *B. japonicum* и 6S-1 РНК *B. subtilis*, полученные с помощью T7-транскрипции и охарактеризованные ранее [11, 13], а также ряд олигорибонуклеотидов – аналогов пРНК, использованных в качестве отрицательных контролей: *Bs14*: 5'-GUUCGGU-CAAAACU-3'; *Bs16*: 5'-AAAGGUUAAAACUUA-3';

Sm16: 5'-CGUGUAUGGCCCCCGGG-3'; *Sm18*: 5'-CGUGUAUGGCCCCCGGGGA-3'; *Sm23*: 5'-CGU-GUAUGGCCCCCGGGGAUUGUG-3'; *Bj17*: 5'-CG-AUAAGGCCCCCGGGGA-3'; *Bj24*: 5'-CGAUAAG-GCCCCCGGGGAUAUAUGG-3' (синтезированы в Сколковском институте науки и технологий, Россия) [11, 13]. Водные растворы РНК в объеме 5 мкл, содержащие 1 мкг 6S РНК, 100 пмоль аналогов пРНК или 10 пмоль положительного контроля для детекции DIG (5'-DIG-aGttTtgAccGac-3', где T – остаток LNA, п – дезоксирибонуклеозид; синтезирован фирмой “Exicon”, Дания), предварительно денатурировали при 95°C (5 мин), быстро охлаждали во льду и сразу наносили на предварительно размеченную положительно заряженную нейлоновую мембрану (Roche, Швейцария) по схеме, приведенной на рис. 2а. Для иммобилизации РНК мембраны облучали УФ-светом (256 нм) в течение 5 мин, а затем прогревали 1 ч при 80°C. Перед гибридизацией мембрану помещали в пластиковый флакон объемом 50 мл с закручивающейся крышкой и промывали 5 мл буфера DIG Easy Hub (Roche, Швейцария) в течение 1 ч при медленном перемешивании.

Транскрипция *in vitro*. Перед реакцией транскрипции проводили ренатурацию 6S РНК (20 пмоль) в 13 мкл буфера TE (10 мМ Tris-HCl,

1 mM EDTA, pH 8.0): образец нагревали до 95°C (2 мин) и далее ступенчато охлаждали (0.5°C/10 с) в амплификаторе t100 (Bio-Rad, США). Затем препараты 6S РНК смешивали с 4 мкл буфера для транскрипции (финальная концентрация (ф.к.): 40 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.01% (v/v) Triton X-100, pH 7.5) и 1 мкл (1 ед. акт.) σ^{70} -холофермента РНКП *E. coli* (New England Biolabs, США) и преинкубировали в течение 10 мин при 37°C для образования комплекса 6S РНК с РНКП. Реакцию инициировали добавлением 2 мкл смеси DIG RNA Labeling (Roche, Швейцария, ф.к.: 1 mM АТР, 1 mM СТР, 1 mM GTP, 650 мкМ UTP, 350 мкМ DIG-11-UTP, pH 7.5) с последующей инкубацией при 37°C в течение 1 ч. Реакцию останавливали добавлением 80 мкл буфера DIG Easy Hyb, прогревали 5 мин при 95°C и медленно добавляли к 5 мл буфера DIG Easy Hyb.

Гибридизация и детекция. Полученный раствор добавляли к промытой мембране и инкубировали в течение 16 ч при комнатной температуре при медленной ротации флакона. Дальнейшие манипуляции по отмывке мембраны и детекции сигналов проводили с помощью коммерческих наборов DIG Wash and Block Buffer Set и DIG Detection Kit (Roche, Швейцария) строго в соответствии с протоколом производителя. Сигналы хемолуминесценции визуализировали посредством системы гель-документации ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, США). На рис. 2 представлены результаты одного из трех независимых экспериментов (начиная со стадии транскрипции *in vitro*) с наиболее четкими сигналами люминесценции.

Подтверждение синтеза DIG-меченных пРНК. Для подтверждения синтеза DIG-пРНК *S. meliloti* и *B. japonicum* после окончания реакции в аликвоту целевой смеси (10 мкл) добавляли 10 мкл формамида, выдерживали при 95°C в течение 10 мин и наносили в 10%-ный неденатурирующий ПААГ. После проведения электрофореза (2 ч, 30 мА, 1× TBE) гель промывали в 0.5× TBE и с помощью прибора Semidry Blotter (Хеликон, Россия) переносили продукты реакции на положительно заряженную нейлоновую мембрану (Roche, Швейцария). Затем РНК иммобилизовали на мембране с помощью 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) [10]. Полученную мембрану тщательно промывали водой и далее проводили прямую детекцию пРНК с помощью коммерческих наборов DIG Wash and Block Buffer Set и DIG Detection Kit (Roche, Швейцария). На рис. 1б представлен результат одного из двух проведенных независимых экспериментов (начиная с реакции транскрипции *in vitro*).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность доц., к.х.н. Т.С. Зацепину (Сколковский институт науки и технологий, Россия) за синтез олигорибонуклеотидов — аналогов пРНК.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-04-00791.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen J., Wassarman K.M., Feng S., Leon K., Feklistov A., Winkelman J.T., Li Z., Walz T., Campbell E.A., Darst S.A. // *Mol. Cell*. 2017. V. 68. P. 388–397. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.006>
2. Wassarman K.M. // *Microbiol. Spectrum*. 2018. V. 6. № 3. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.RWR-0019-2018>
3. Wassarman K.M., Saecker R.M. // *Science*. 2006. V. 314. P. 1601–1603. <https://doi.org/10.1126/science.1134830>
4. Буренина О.Ю., Елкина Д.А., Хартманн Р.К., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. // *Биохимия*. 2015. Т. 80. С. 1641–1661. [Burenina O.Y., Elkina D.A., Hartmann R.K., Oretskaya T.S., Kubareva E.A. // *Biochemistry (Mosc)*. 2015. V. 80. P. 1429–1446.] <https://doi.org/10.1134/S0006297915110048>
5. Wehner S., Damm K., Hartmann R.K., Marz M. // *RNA Biol*. 2014. V. 11. P. 1467–1478. <https://doi.org/10.4161/rna.29894>
6. Wurm R., Neusser T., Wagner R. // *Biol. Chem*. 2010. V. 391. P. 187–196. <https://doi.org/10.1515/BC.2010.018>
7. Beckmann B.M., Hoch P.G., Marz M., Willkomm D.K., Salas M., Hartmann R.K. // *EMBO J*. 2012. V. 31. P. 1727–1738. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.23>
8. Hoch P.G., Schlereth J., Lechner M., Hartmann R.K. // *RNA*. 2016. V. 22. P. 614–622. <https://doi.org/10.1261/rna.055616.115>
9. Elkina D.A., Weber L., Lechner M., Burenina O.Y., Kubareva E.A., Hartmann R.K., Klug G. // *RNA Biol*. 2017. V. 14. P. 1627–1637. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1342933>
10. Damm K., Bach S., Müller K.M., Klug G., Burenina O.Y., Kubareva E.A., Grünweller A., Hartmann R.K. // *Methods Mol. Biol*. 2015. V. 1296. P. 41–51. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2547-6_5

11. Burenina O.Y., Hoch P.G., Damm K., Salas M., Zatsepin T.S., Lechner M., Oretskaya T.S., Kubareva, E.A., Hartmann R.K. // *RNA*. 2014. V. 20. P. 348–359. <https://doi.org/10.1261/rna.042077.113>
12. Beckmann B.M., Burenina O.Y., Hoch P.G., Kubareva E.A., Sharma C.M., Hartmann R.K. // *RNA Biol.* 2011. V. 8. P. 839–849. <https://doi.org/10.4161/rna.8.5.16151>
13. Burenina O.Y., Elkina D.A., Migur M.Y., Oretskaya T.S., Evgueniya-Hackenberg E., Hartmann R.K., Kubareva E.A. // *J. Microbiol.* 2020. V. 58. P. 945–956. <https://doi.org/10.1007/s12275-020-0283-1>
14. Kim S.W., Li Z., Moore P.S., Monaghan A.P., Chang Y., Nichols M., John B. // *Nucleic Acids Res.* 2010. V. 38. P. e98. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1235>

Detection of Small pRNA – Products of Transcription from 6S RNA – by “Mirror-Like” Northern Blot Hybridization

O. Y. Burenina*, **, #, T. S. Oretskaya**, and E. A. Kubareva**

#Phone: +7 (495) 939-54-11; e-mail: alunit@inbox.ru

*Skolkovo Institute of Science and Technology, ul. Nobelya 3, Moscow, 121205 Russia

**Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Leninskie gory 1, Moscow, 119991 Russia

Investigation of RNAs with a length less than 30 nucleotides, in particular, microRNAs and other extremely short non-coding RNAs, is often associated with difficulties in detecting them not only *in vivo*, but also *in vitro*. One of these molecules is bacterial pRNA (“product RNA”) that is synthesized by RNA polymerase on 6S RNA as a template. The classical method for identifying pRNA is Northern blot hybridization with complementary DNA probes containing various labels and modified nucleosides. However, this method is not suitable for searching for new pRNAs which sequences are unknown. It is also quite expensive and time-consuming. We have proposed a new simple way to determine the fact of pRNA synthesis on the template of 6S RNA that we called “mirror-like” Northern blotting. It does not require gel electrophoresis, and the pRNA, newly formed during transcription, act as a probe itself due to containing digoxigenin (DIG) residues. This approach will allow fast screening of new 6S RNAs or their mutant variants for their ability to serve as templates for pRNA synthesis and the estimation of its efficacy.

Keywords: 6S RNA, pRNA, Northern blotting, digoxigenin