



УДК 577.217.34
© 1991 г.

Д. М. Грайфер, М. А. Зенкова, А. А. Малыгин,
С. В. Мамаев, Д. А. Мундус, Г. Г. Карпова

УЧАСТОК 18S рРНК, ЛОКАЛИЗОВАННЫЙ В ОБЛАСТИ мРНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ЦЕНТРА РИБОСОМ ИЗ ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА

Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения АН СССР,
630090

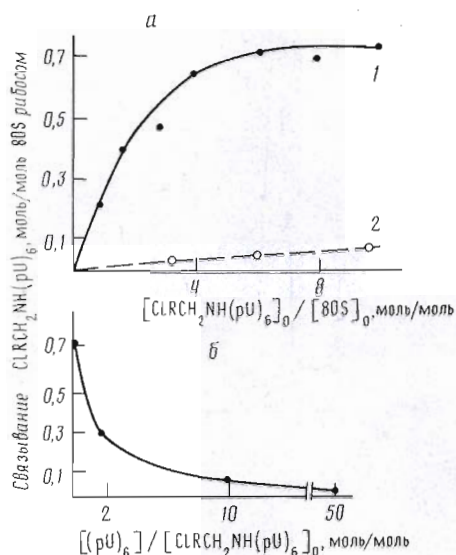
Изучена аффинная модификация 80S рибосом из плаценты человека 4-(N-метиламино-N-2-хлорэтил)бензил-[5'-³²P]фосфамидом гексауридилата в присутствии кодон-специфичной тРНК^{Phe} из *E. coli*. Данный аналог мРНК имеет нормальные кодирующие свойства, поскольку его связывание с плацентарными рибосомами существенно зависит от наличия тРНК^{Phe}. В составе комплекса с рибосомами и Phe-тРНК^{Phe} наблюдается ковалентное присоединение аналога мРНК исключительно к малой субчастице, а в ее составе основной мишенью модификации является 18S рРНК. С помощью блот-гибридизации модифицированной рРНК с фрагментами рестрикции рДНК локализован участок 975—1055, в пределах которого находится сайт присоединения реагента. Данный фрагмент находится в высококонсервативной части домена II рРНК малой субчастицы.

В настоящее время считается общепринятым, что основополагающую роль в функционировании рибосомы играет рРНК (обзор см. [1]). В рибосомах ряда прокариот изучены конкретные участки рРНК, отвечающие за ту или иную функцию рибосомы либо взаимодействующие с тем или иным лигандом [1]. В последнем случае участки идентифицируются различными косвенными методами (защита их лигандами от ферментативного гидролиза или химической модификации, влияние природной или искусственной мутации в интересующей области на образование соответствующего комплекса) либо непосредственно по ковалентному присоединению лиганда к рРНК в составе комплекса с рибосомой. Однако даже на рибосомах *E. coli* к настоящему времени выполнено всего несколько работ, в которых идентифицирован сайт присоединения лиганда (тРНК или матрицы) к рРНК, — например, идентификация сайта фотосшивки 5'-антикодоновых оснований тРНК с 16S рРНК *E. coli* (основания C¹⁴⁰⁰), входящего в высококонсервативный фрагмент рРНК малой субчастицы про- и эукариот [2, 3]. В этом же районе идентифицирована сайт фотосшивки синтетической матрицы poly(A) с рибосомной РНК в составе рибосом — область 1394—1399 [4]. Наконец, в области пептидилтрансферазного центра идентифицированы остатки уридина в положениях 2584/2585 23S рРНК, которые подвергались аффинной модификации производным Phe-тРНК^{Phe} с реакционноспособной группой на аминокислотном остатке [5]. Информации о контактах с рРНК других конкретных участков тРНК и частей матрицы (5'-конца, 3'-конца и т. д.) в литературе практически нет.

Для аффинной модификации мРНК-связывающего центра рибосом *E. coli* и эукариот (печени крысы) оказалось продуктивным использование алкилирующих аналогов мРНК — производных олигорибонуклеотидов, несущих 4-(N-метиламино-N-2-хлорэтил)фенильную группировку

Сокращения: ClRCI₂NH(pU)₆ — 4-(N-метиламино-N-2-хлорэтил)бензил-[5'-³²P]-фосфамид гексауридилата; HORCH₂NH(pU)₆ — аналогичное N-2-гидроксэтилпроизводное; ITS — внутренний транскрибируемый спейсер; ETS — внешний транскрибируемый спейсер.

Рис. 1. Связывание $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pU})_6$ с 80S рибосомами: а — в присутствии $\text{Phe-tPHK}^{\text{Phe}}$ (1) и в ее отсутствие (2); б — в присутствии $\text{Phe-tPHK}^{\text{Phe}}$ и немеченого $(\text{pU})_6$ при различных концентрациях последнего; $[\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pU})_6]_0$ 10^{-6} М. $[\text{80S}]_0$ $1,7 \cdot 10^{-7}$; $[\text{Phe-tPHK}^{\text{Phe}}]$ $9 \cdot 10^{-7}$ М. Реакционные смеси содержали по 3 пмоль 80S рибосом



на 3'- или 5'-конце [6—9]. Эти производные в составе различных специфических комплексов с рибосомами и кодон-специфичными тРНК модифицировали как белки, так и рРНК. Модификация белков данными аналогами мРНК была детально изучена как на рибосомах *E. coli* [6], так и на рибосомах из печени крысы [7—9], в то время как сайты присоединения аналогов мРНК к рРНК идентифицированы не были.

В настоящей работе исследована аффинная модификация 80S рибосом из плаценты человека 4-(N-метиламино-N-2-хлорэтил)бензил-[5'- ^{32}P]-фосфамидом $(\text{pU})_6$ в присутствии $\text{Phe-tPHK}^{\text{Phe}}$.

Связывание $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pU})_6$ с 80S рибосомами

Аналог мРНК может быть пригоден для аффинной модификации рибосом в том случае, если введенная в него химическая группировка не препятствует образованию функционально корректных комплексов с участием данного аналога. Как видно из данных, приведенных на рис. 1а, 80S рибосомы способны связывать $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pU})_6$, причем связывание практически полностью зависит от наличия $\text{Phe-tPHK}^{\text{Phe}}$. Используемая концентрация тРНК ($9 \cdot 10^{-7}$ М) является насыщающей, поскольку ее дальнейшее увеличение не приводило к заметным изменениям изотермы адсорбции производного $(\text{pU})_6$ на рибосомах (данные не приведены). Следовательно, наличие алкилирующей группы в аналоге мРНК не препятствует его узнаванию рибосомой и кодон-антикодоновым взаимодействиям.

Свободный гексауридилат ингибирует связывание реагента (см. рис. 1б), причем из кривой ингибирования можно сделать вывод, что константы тРНК^{Phe}-зависимой ассоциации $(\text{pU})_6$ и его производного с рибосомами находятся в пределах одного порядка. При значительном (50-кратном) избытке $(\text{pU})_6$ по отношению к $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pU})_6$ связывание последнего практически не регистрируется; следовательно, возможного неспецифического «налипания» реагента на рибосому за счет гидрофобной ароматической 2-хлорэтиламиногруппы не происходит. Таким образом, данное алкилирующее производное применимо для аффинной модификации рибосом из плаценты человека в районе мРНК-связывающего центра.

Ковалентное присоединение $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pU})_6$ к рибосомам

Известно, что алкилирование ароматическими 2-хлорэтиламинами протекает через алкилирующую стадию поизвацца С—Сл-связи с образованием этилениммониевого катиона, который далее быстро взаимодействует с нуклеофильными центрами биополимеров и компонентов буфера [10]. Для ClRCH_2NH -производных олигонуклеотидов константа ионизации

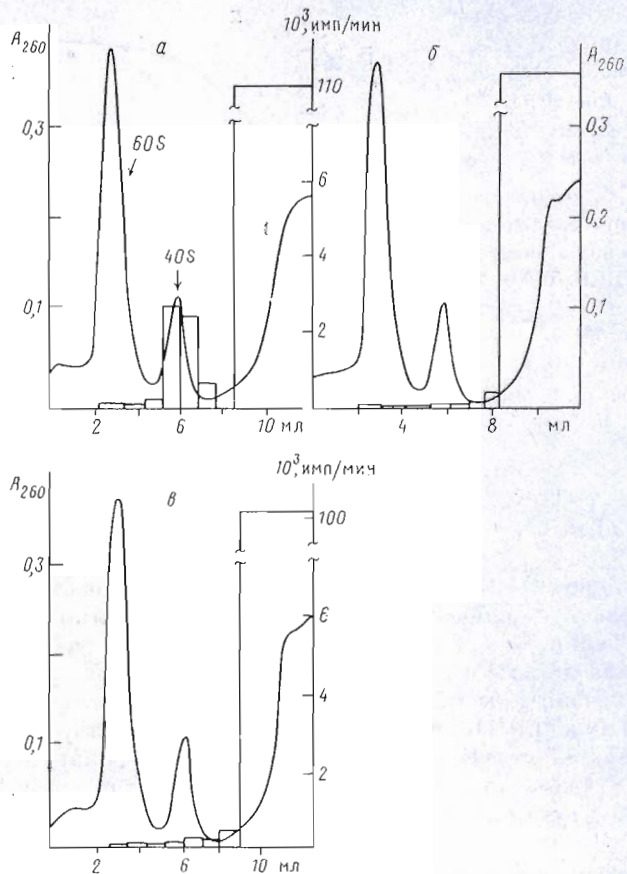
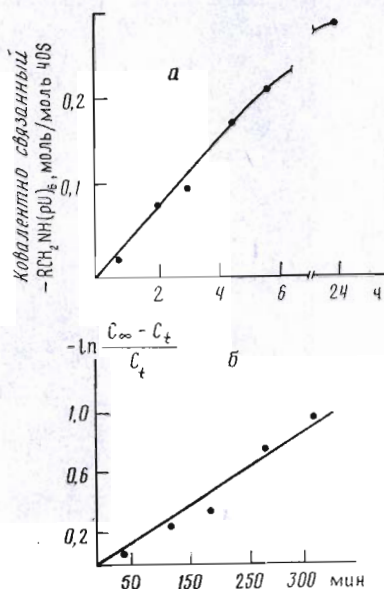


Рис. 2. Профили седиментации (условия см. «Экспер. часть») рибосомных субчастиц из комплексов 80S рибосом с Phe-тРНК^{Phe} и с ClRCH₂NH(pU)₆ (а), HORCH₂NH(pU)₆ (б), ClRCH₂NH(pU)₆ в присутствии 1,5·10⁻⁶ М немеченого (pU)₆ (в) после выдерживания комплексов в условиях модификации (20° С, 6 ч) и последующего их разрушения. Концентрации 80S и Phe-тРНК^{Phe} см. рис. 1. Концентрация производных (pU)₆ 10⁻⁶ М. Реакционные смеси содержали по 28 нмоль 80S рибосом

C—Cl-связи составляет примерно $1,6 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ при 20° С в нейтральной среде [11], что соответствует времени полупревращения 12 ч. Для получения комплексов в экспериментах по аффинной модификации ClRCH₂NH(pU)₆ брали в 6-кратном избытке по отношению к рибосомам (условия насыщения рибосом реагентом — см. рис. 1а).

Комплексы выдерживали при 20° С в течение 6 ч, разрушали и анализировали распределение метки между рибосомными субчастицами центрифугированием в сахарозном градиенте (рис. 2а). В контрольных экспериментах при образовании комплекса в реакционную смесь добавляли избыток конкурента, немеченого (pU)₆, или вместо алкилирующего производного брали его неспособный к алкилированию аналог HORCH₂NH(pU)₆. Видно, что модификации аналогом мРНК подвергается исключительно 40S субчастица. При использовании HORCH₂NH(pU)₆, уровень связывания которого с рибосомами не отличался от такового для алкилирующего производного (данные не приведены), метка ³²P во фракциях рибосомных субчастиц практически не обнаруживалась (рис. 2б). Следовательно, в выбранных условиях происходит количественное разрушение комплексов аналогов мРНК с рибосомами и наличие метки во фракциях 40S субчастиц при использовании ClRCH₂NH(pU)₆ можно объяснить только ковалентным присоединением производного мРНК к субчастице. Избыток немеченого (pU)₆ приводит к почти полному ингибиро-

Рис. 3. Кинетическая кривая (а) модификации 80S рибосом $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pU})_6$ (10^{-6} М) в присутствии $\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ и ее линейная анаморфоза (б). C_∞ и C_t — соответственно предельная и текущая концентрации модифицированных 40S субчастиц



ванию модификации рибосом (см. рис. 2а). Значит, модификация 40S субчастиц происходит исключительно в составе специфического комплекса (т. е. не наблюдается модификации рибосом избытком реагента из раствора).

Для подбора оптимального времени инкубации комплекса рибосом с $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pU})_6$ и $\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ с целью получения максимального выхода продуктов модификации была изучена кинетика алкилирования рибосом в составе данного комплекса. Как видно из рис. 3, за 6 ч реакция проходит более чем на 50%; при более длительных временах инкубации можно было бы ожидать еще некоторого увеличения выхода продуктов модификации. Однако при значительных (более 10 ч) временах инкубации при 20°C начинается заметная деградация рибосом. Поэтому 6 ч — оптимальное время инкубации, при котором до 30% производного $(\text{pU})_6$, находившегося в комплексе, оказывается ковалентно присоединенным к рибосомам.

Константа скорости реакции первого порядка, оцененная из данных рис. 3, составляет $(4 \pm 1) \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$, что соответствует времени полупревращения 5 ч. Эти значения сравнимы с литературными данными для ионизации связи $\text{C}-\text{Cl}$ в ClRCH_2NH -производных олигонуклеотидов [11]. Следовательно, можно полагать, что алкилирование рибосом этими производными также происходит через лимитирующую стадию ионизации связи $\text{C}-\text{Cl}$.

Выделение 18S рРНК

18S рРНК выделяли из модифицированных 40S субчастиц (после осаждения их этанолом из фракций сахарозного градиента) фенольной депротенизацией с последующей очисткой этанольными осадками. Более 80% метки ^{32}P , находившейся во фракции модифицированных 40S субчастиц, оказалось в выделенном препарате рРНК. Корреляция этой величины с выходом самой рРНК, определенным по оптической плотности (также $\sim 80\%$), может свидетельствовать в пользу того, что модификация в составе комплекса 80S рибосом с $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pU})_6$ и $\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ подвергается в основном 18S рРНК. Полученные данные указывают на существенные различия в направлении аффинной модификации в рибосомах из плаценты человека и рибосомах *E. coli* (в комплексах с последними аналогичные производные олигоуридилатов модифицировали наряду с малой также и большую субчастицу, а в составе обеих субчастиц — как РНК, так и белки [6]). Более того, заметные различия наблюдаются и при сопоставлении полученных нами результатов с данными по алкилированию

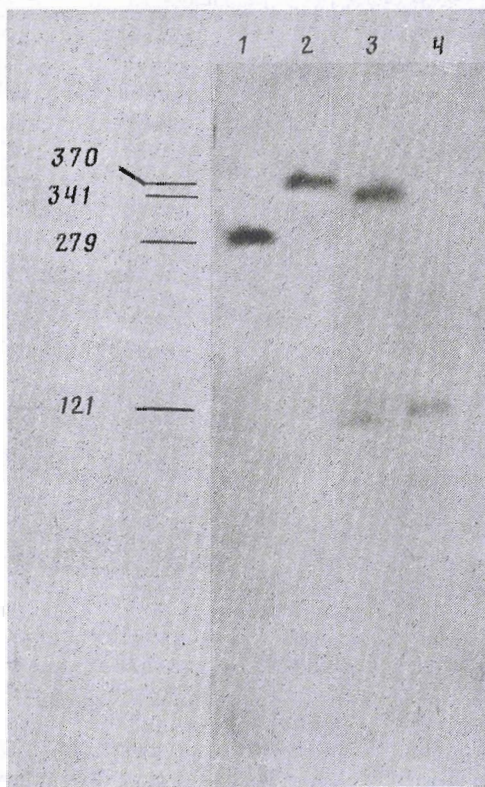


Рис. 4. Блот-гибридизация по Саузерну (см. [23]) продуктов рестрикции (1 — *Alu* I, 2 — *Sau*3A, 3 — *Hae*III, 4 — *Msp*I) *Sal*I — *Kpn*I-фрагмента плазмиды рНг13 с модифицированной [³²P]18S рРНК. Радиоавтограф. Слева указаны размеры фрагментов (п. о.)

рибосом из печени крысы ClRCH₂NH-производными олигоуридилатов [7, 9], где, как и в случае плацентарных рибосом, модификации подвергались практически лишь 40S субчастицы, но в их составе — как рРНК, так и белки. Эти изменения в направлении аффинной модификации и особенно высокая избирательность модификации в случае рибосом человека свидетельствуют о различиях в организации мРНК-связывающего центра у прокариот и эукариот и даже у разных видов эукариот.

Определение участков 18S рРНК, модифицированных ClRCH₂NH(pU)₆, проводили с помощью гибридизации модифицированной 18S рРНК, несущей метку ³²P, с фрагментами рестрикции плазмиды рНг13, содержащей полную последовательность рибосомных РНК из плаценты человека [12]. Фрагмент *Sal*I — *Kpn*I длиной около 3200 п. о., включающий кроме полной последовательности 18S рРНК часть внутреннего (ITS) и внешнего (ETS) транскрибируемых спейсеров, был вырезан из плазмиды рНг13 с помощью двух последовательных рестрикций: *Sal*I и *Kpn*I [12]. Выделенный фрагмент *Sal*I — *Kpn*I гидролизовали в параллельных экспериментах рестриктазами *Hae*III, *Alu*I, *Msp*I и *Sau*3A. Образовавшиеся в результате рестрикции фрагменты ДНК известного размера (в качестве маркеров использовали продукты гидролиза плазмиды рTZ18U рестриктазой *Msp*I) разделяли электрофорезом в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) и переносили на капроновый фильтр. Для однозначного определения положения на фильтре всех фрагментов рестрикции, содержащих участки 18S рРНК, их гибридизовали с ³²P-меченым частичным щелочным гидролизатом немодифицированной 18S рРНК. Отнесение сигналов гибридизации проводили, сопоставляя размеры гибридизующихся фрагментов ДНК с картой рестрикции фрагмента *Sal*I — *Kpn*I и последовательностью 18S рРНК.

Первичная структура внутренних и внешних транскрибируемых спей-

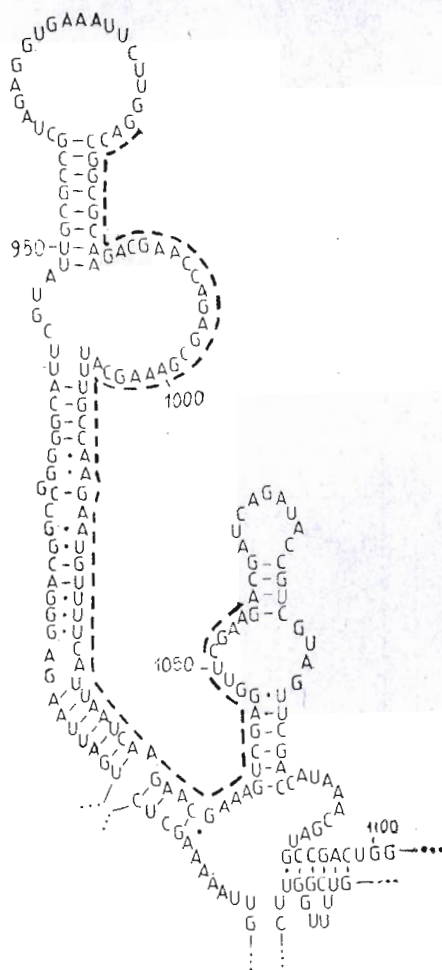


Рис. 6. Центральный фрагмент домена II 18S рРНК мыши [13]. Штриховой линией отмечен участок, идентифицированный нами как сайт алкилирования производным $(pU)_6$

серов неизвестна. Поэтому невозможно определить те фрагменты рестрикции, которые соответствуют 3'- и 5'-концам молекулы 18S рРНК, что составляет около 100 нуклеотидов с каждого из концов. На рис. 4 приведен радиоавтограф фильтра после гибридизации модифицированной 18S рРНК и последующей обработки РНКазой А. После такой обработки связанными с фрагментами ДНК на фильтре остаются только те части модифицированной 18S рРНК, которые полностью защищены комплексобразованием. Обнаружение радиоактивной метки в месте, соответствующем какому-либо определенному фрагменту рестрикции, будет свидетельствовать о наличии сайта аффинной модификации 18S рРНК внутри участка РНК, соответствующего данному фрагменту рестрикции.

Согласно рис. 4 и 5, модификация $ClRCH_2NH(pU)_6$ подвергается единственный участок 18S рРНК длиной 81 нуклеотид в положении 975—1055. Для локализации данного участка на вторичной структуре 18S рРНК млекопитающих мы использовали структуру 18S рРНК мыши (длина 1874 нуклеотидных остатка) [13], консервативная часть которой должна практически полностью повторять таковую 18S рРНК человека (длина 1869 нуклеотидных звеньев [12]) [1]. Как видно из рис. 6, участок модификации производным $(pU)_6$ локализован в центральном фрагменте домена II 18S рРНК. Этот фрагмент принадлежит к эволюционно консервативной коровой части молекулы рРНК малой субчастицы и содержит около 20 консервативных оснований [1] (см. рис. 7).

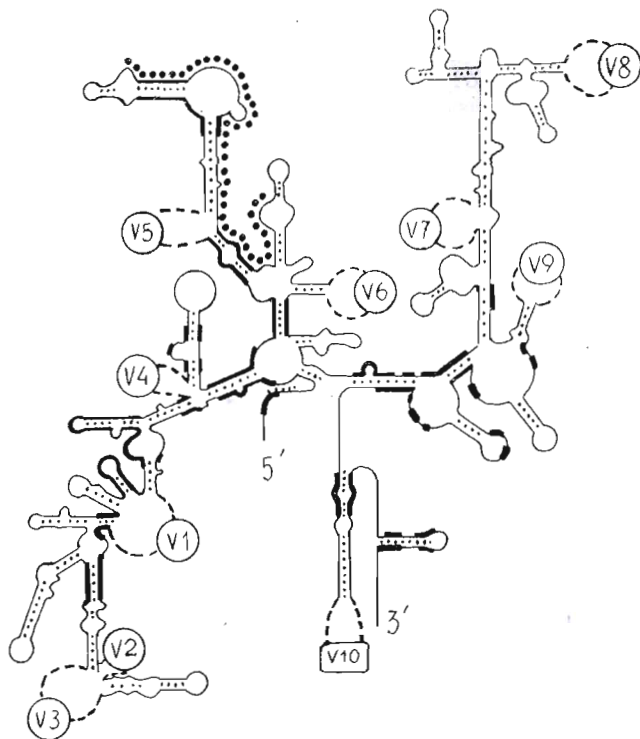


Рис. 7. Эволюционно консервативные фрагменты рРНК малой субчастицы [1]. Варибельные районы обозначены схематически штриховой линией и нумерованы с 5'-конца. Районы, консервативные во всех классах рибосом, кроме митохондриальных, изображены сплошной линией, а во всех классах, включая митохондриальные, — жирной. Спиральные участки изображены схематично: число точек внутри спирали не отражает числа пар оснований. Участок алкилирования плацентарной 16S рРНК $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pU})_6$ (на схеме вверху слева) отмечен зачерненными кружками

Поскольку данных о роли рРНК в формировании функциональных центров эукариотических рибосом практически нет, полученные в настоящей работе результаты можно сопоставлять только с данными по рибосомам *E. coli*. Это имеет определенный смысл, поскольку идентифицированный нами участок 975—1055 лежит в высококонсервативной части вторичной структуры рРНК малой субчастицы (соответствующие координаты для 16S рРНК *E. coli* 703—783 — спирали 20, 22, 23 и 24 — см. [1]). Так, основания 16S рРНК в петлях, замыкающих спирали 23 и 24, защищаются от химической модификации при связывании тРНК в Р-сайте рибосом [14]. Это согласуется с нашими данными по модификации этого же района аналогом мРНК с модифицирующей группой именно на 5'-конце. Петля, замыкающая спираль 24, важна для ассоциации рибосомных субчастиц [15]. Наконец, следует отметить, что на модели пространственной структуры 16S рРНК в составе малой субчастицы [4, 16] петли, замыкающие спирали 22 и 24, находятся довольно близко от района C^{1400} , в котором расположены сайты фотосшивки 5'-антикодоновых оснований тРНК [2, 3] и матрицы poly(A) [4] с 16S рРНК.

Экспериментальная часть

В работе использовали [^{14}C]фенилаланин (318 мКи/ммоль, UVVVR, ЧСФР), [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]АТФ (отечественное производство), Т4-полинуклеотидкиназу (НПО «Фермент», Вильнюс), poly(U) и poly(A) (Reanal, Венгрия), среды (Gibco, Англия), агарозу (Sigma, США), капроновую мембрану с диаметром пор 0,2 мкм (экспериментальная лаборатория «Хийу Калгур», Эстония), рестриктазы *SalI*, *KpnI*, *Sau3A*, *MspI*, *HaeIII* и *AclI* (НПО

«Вектор», Новосибирская обл.), рибонуклеазу А (Calbiochem, США).

Плазмида pHr13 была любезно предоставлена проф. В. Е. Н. Maden (Англия). Плазмида pTZ18U — фирмы Pharmacia (Швеция). Гексауриндилат (pU)₆ получали гидролизом poly(U) [17]; введение метки ³²P в (pU)₆ проводили согласно методике [18].

CIRCH₂NH(pU)₆ получали по описанной методике [19] с небольшими модификациями, обрабатывая 0,1 М раствор меченого (pU)₆ 0,5 М CIRCH₂NH₂ в присутствии конденсирующего реагента — смеси 0,5 М трифенилфосфина и 0,5 М дипиридилдисульфида. В качестве катализатора использовали 1 М метилимидазол. Выдержав 20 мин при 20° С, олигонуклеотидный материал из реакционной смеси осаждали 2% LiClO₄ в ацетоне. CIRCH₂NH(pU)₆ выделяли обращенно-фазовой хроматографией на Lichrosorb RP-18 (элюция градиентом метанола в водном растворе 50 мМ триэтиламмоний-ацетата, pH 7,5). Продукт был гомогенным по данным рехроматографии в указанной системе. Содержание ковалентно связанного хлора (90—95%) в препарате определяли по реакции с тиосульфатом натрия с последующим хроматографическим анализом (см. выше). Удельная радиоактивность препарата была в пределах (5—12) · 10⁸ имп/(мин · пмоль) по Черенкову к моменту выделения.

HORCH₂NH(pU)₆ получали инкубацией CIRCH₂NH(pU)₆ в буфере А (см. ниже) в течение 18 ч при 20° С.

40S и 60S рибосомные субчастицы выделяли из нормальной послеродовой плаценты человека, как описано в работе [20]. Для получения 80S рибосом субчастицы реактивировали 20 мин при 37° С в буфере А (120 мМ KCl, 13 мМ MgCl₂, 0,6 мМ EDTA, 20 мМ трис-HCl, pH 7,5) и смешивали в мольном соотношении 40S : 60S = 1 : 1,3 (полагая, что 1 OE₂₆₀ содержит 50 пмоль 40S и 25 пмоль 60S субчастиц). Полученные рибосомы были способны неэнзиматически связывать до 0,7 моль [¹⁴C]Phe-tPНК^{Phe} на 1 моль рибосом в присутствии poly(U), причем около 70% связанной аминоксил-tPНК принимало участие в образовании дифенилаланина (определенного как описано Кирилловым и соавт. [21]).

Phe-tPНК^{Phe} из *E. coli* выделяли по методу Булычева и соавт. [22].

Комплексы Phe-tPНК^{Phe} *E. coli*, (pU)₆ и его производного с рибосомами получали инкубацией компонентов при 0° С в буфере А в течение 40 мин и тестировали фильтрацией через нитроцеллюлозные фильтры. Концентрация рибосом составляла 1,7 · 10⁻⁷ М, а Phe-tPНК^{Phe} — 9 · 10⁻⁷ М (если не указано особо).

Разрушение комплексов tPНК и производного (pU)₆ с рибосомами проводили добавлением 0,1 М EDTA (pH 7,5), 3 М KCl и меркаптоэтанола до конечных концентраций соответственно 10, 500 и 20 мМ и инкубировали 5 мин при 37° С.

Модификация 80S рибосом CIRCH₂NH(pU)₆ в присутствии Phe-tPНК^{Phe}. а) Кинетика. Реакционная смесь содержала 48 пмоль 80S рибосом и по 250 пмоль Phe-tPНК^{Phe} и CIRCH₂NH(pU)₆. Смесь инкубировали 50 мин при 0° С, затем при 20° С. По мере инкубации при 20° С из реакционной смеси отбирали аликвоты по 1/50 объема и замораживали в жидком азоте. Затем все аликвоты одновременно размораживали, проводили разрушение комплексов, добавляли к каждой аликвоте по 20 пмоль 40S и 60S субчастиц (носитель) и анализировали центрифугированием в градиенте концентрации сахарозы.

б) Деление модифицированных рибосом на субчастицы проводили центрифугированием разрушенных (см. выше) комплексов рибосом с Phe-tPНК^{Phe} и производным (pU)₆ в градиенте концентрации (10—30%) сахарозы в буфере (500 мМ KCl, 3 мМ MgCl₂, 0,2 мМ EDTA, 10 мМ меркаптоэтанол, 20 мМ трис-HCl, pH 7,5). Условия центрифугирования: центрифуга Bechman L8M (США), ротор SW-40, 21 000 об/мин, 17 ч, 4° С. По окончании центрифугирования содержимое пробирок фракционировали через проточную клетку микроспектрофотометра «Миличром», во фракциях просчитывали радиоактивность.

Выделение модифицированных 40S субчастиц. К фракции 40S субчастиц (содержащей метку ³²P) из сахарозного градиента добавляли 1/100 объема

2 М $MgCl_2$ и 0,9 объема охлажденного до $-40^\circ C$ этанола. После выдерживания в течение 50 мин при $-5^\circ C$ осадок субчастиц отделяли центрифугированием (ротор TST-60, 30 000 об/мин, $4^\circ C$, 35 мин).

Выделение 18S рРНК из модифицированных 40S субчастиц. Осадок 40S субчастиц растворяли в 200 мкл буфера Б (10 мМ трис-НСl, рН 8,0; 1 мМ EDTA) и проводили трехкратную фенольную депротеинизацию 18S рРНК равным объемом фенола, насыщенного тем же буфером. Интерфазу и объединенную фенольную фракцию промывали 2 раза по 100 мкл буфера Б. По окончании депротеинизации к водной фазе, содержащей 18S рРНК и практически всю метку ^{32}P , включившуюся в 40S субчастицы, добавляли 0,2 мкг poly(A), 10 мкг денатурированной ДНК из спермы лосося в качестве носителя, 0,1 объема 3 М ацетата натрия, рН 5,5, и 3 объема холодного этанола. Осадок 18S рРНК и носителя отделяли центрифугированием после выдерживания в течение 5 мин в жидком азоте. Затем проводили повторное переосаждение полученного препарата модифицированной 18S рРНК из 0,3 М ацетата натрия, рН 5,5, этанолом. За полной осаждения следили по метке ^{32}P .

Выделение и рестрикция плазмиды рHr13. Клетки *E. coli* HB 101 трансформировали ДНК плазмиды рHr13; трансформированные клетки выращивали на среде L13 в 4-литровом ферментере фирмы LKB в присутствии 50 мкг/мл ампициллина до середины логарифмической фазы, затем проводили амплификацию по известной методике [23]. Плазмиду рHr13 выделяли обычным щелочным способом и очищали с помощью гель-фильтрации на сефарозе CL-4В. Фрагмент *SalI*—*KpnI* длиной около 3200 п. о., образовавшийся в результате гидролиза плазмиды рHr13 рестриктазами *SalI* и *KpnI*, выделяли электрофорезом в 1% агарозе с последующей электрооэлюцией на диализную мембрану. Выделенный фрагмент разделяли на четыре порции и проводили рестрикцию *MspI*, *HaeIII*, *AluI* или *Sau4A*. Каждый из четырех полученных гидролизатов разделяли электрофорезом в 10% ПААГ ($15 \times 20 \times 0,05$ см); электрофорез проводили до выхода бромфенолового синего из геля. Фрагменты ДНК окрашивали в геле бромистым этидием и проводили электроперенос на капроновую мембрану в течение 30 мин (при силе тока 0,5 А). Фрагменты ДНК иммобилизовали на мембране с помощью УФ-облучения.

Гибридизация. Фильтр с иммобилизованными фрагментами ДНК прединкубировали, как описано ранее [24], при $37^\circ C$ в течение 6 ч в буфере следующего состава: 50% формамид; 10 мМ трис-НСl, рН 7,5; 1 мМ EDTA; 0,1% SDS; $5 \times SSC$ *; $4 \times$ Денхардт**; 10 мкг/мл денатурированной ДНК из спермы лосося; 0,1 мкг/мл poly(A). Затем в течение 18 ч в том же буфере проводили гибридизацию фильтра с модифицированной 18S рРНК (содержащей метку примерно 20 000 имп/мин по Черенкову). Объем буфера гибридизации 2 мл. После гибридизации фильтр промывали при $37^\circ C$ 2 раза по 15 мин в буфере $2 \times SSC$, 0,1% SDS, затем 2 раза по 15 мин в буфере $0,1 \times SSC$, 0,1% SDS. Отмытый таким образом фильтр инкубировали 30 мин при $37^\circ C$ с раствором РНКазы А (40 мкг/мл) в $2 \times SSC$ как описано в работе [5]. После инкубации с ферментом фильтр промывали так же, как и в первый раз. Влажный фильтр экспонировали при $0^\circ C$ в течение 20 сут на рентгеновскую пленку РМВ-1 с усиливающим экраном.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Raue H. A., Klootwijk J., Musters W. // Progr. Biophys. Molec. Biol. 1988. V. 51. P. 77—129.
2. Prince J. B., Taylor B. H., Thurlow D. L., Ofengand J., Zimmermann R. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 18. P. 5450—5454.
3. Ofengand J., Gornicki P., Chakraborty K., Nurse K. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 9. P. 2817—2821.
4. Stiege W., Stade K., Schüler D., Brimacombe R. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 6. P. 2369—2387.

* $1 \times SSC$: 0,15 М NaCl, 0,015 М цитрат натрия.

** $1 \times$ Денхардт: 0,1% фикола-400, 0,1% бычий сывороточный альбумин; 0,1% поливинилпирролидон.

5. Barta A., Steiner G., Brosius J., Noller H. F., Kuechler E. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 12. P. 3607—3611.
6. Vladimirov S. E., Babkina G. T., Venijaminova A. G., Gimautdinova O. I., Zenkova M. A., Karpova G. G. // Biochim. et biophys. acta. 1990. V. 1048. № 2 / 3. P. 245—256.
7. Stahl J., Karpova G. G. // Biomed. et biochim. acta. 1985. V. 44. № 7/8. P. 1057—1064.
8. Stahl J., Kobetz N. D. // FEBS Lett. 1981. V. 123. № 2. P. 269—272.
9. Stahl J., Kobetz N. D. // Mol. Biol. Rep. 1984. V. 9. № 2. P. 219—222.
10. Беликова А. М., Вахрушева Т. Е., Власов В. В., Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Теплова Н. М. // Молекуляр. биология. 1970. Т. 4. № 1. С. 30—36.
11. Гринева Н. И., Ломакина Т. С., Тугеева Н. Т., Чимитова Т. А. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 2. С. 210—214.
12. Maden B. E. H., Dent C. L., Farrell T. E., Garde J., McCallum F. S., Wakeman J. A. // Biochem. J. 1987. V. 246. № 3. P. 519—522.
13. Chan Y.-L., Gutell R., Noller H. F., Wool I. G. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 2. P. 224—230.
14. Moazed D., Stern S., Noller H. F. // J. Mol. Biol. 1986. V. 187. № 2. P. 399—416.
15. Noller H. F. // Ann. Rev. Biochem. 1984. V. 53. № 1. P. 119—162.
16. Brimacombe R., Atmadja J., Stiege W., Schüler D. // J. Mol. Biol. 1988. V. 199. № 1. P. 115—136.
17. Василенко С. К., Сербо Н. А., Веньяминова А. Г., Болдырева Л. Г., Буджер В. Г., Кобец Н. Д. // Биохимия. 1976. Т. 41. № 2. С. 260—263.
18. Грайфер Д. М., Зенкова М. А., Малыгин А. А., Матасова Н. Б., Карпова Г. Г. // Молекуляр. биология. 1990. Т. 24. № 4.
19. Гимаутдинова О. И., Карпова Г. Г., Козырева Н. А. // Молекуляр. биология. 1982. Т. 16. Вып. 4. С. 752—761.
20. Бабкина Г. Т., Владимиров С. Н., Грайфер Д. М., Карпова Г. Г., Матасова Н. Б., Смоленская И. А. // Изв. СО АН СССР. Сер. биол. наук. 1989. Вып. 2. С. 92—98.
21. Kirillov S. V., Makhno V. I., Semenkou Yu. P. // Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. № 1. P. 183—196.
22. Бульчев Н. В., Грайфер Д. М., Карпова Г. Г., Лебедев А. В. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 1. С. 27—30.
23. Маннатиус Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. Пер. с англ. М.: Мир, 1984. С. 74—83.
24. Mason Ph. J., Williams J. G. // Nucleic acid hybridization. A practical approach./ Eds Hames B. D., Higgins S. J. Oxford — Washington: IRL Press, 1986. P. 113—138.

Поступила в редакцию
23.1.1990

D. M. GRAIFER, M. A. ZENKOVA, A. A. MALYGIN, S. V. MAMAEV,
D. A. MUNDUS, G. G. KARPOVA

IDENTIFICATION OF A SITE ON 18S rRNA OF HUMAN PLACENTA RIBOSOMES IN THE REGION OF THE mRNA BINDING CENTRE

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division,
Academy of Sciences of the USSR*

The affinity labelling of human placenta 80S ribosomes by 4-(N-2-chloroethyl-N-methylamino)benzyl-5'-phosphoramidate of hexauridylate has been studied. This mRNA analogue has normal coding properties because its binding to placenta ribosomes significantly increases in the presence of the cognate tRNA^{Phe}. Incubation of the mRNA analogue in the complex with ribosomes and Phe-tRNA^{Phe} leads to its covalent attachment exclusively to the small subunit (mainly to 18S rRNA). The reaction site has been shown by hybridisation experiments to be located within positions 975—1055 of 18S rRNA. The identified fragment is located in a highly conserved part of the small subunit rRNA domain II.