



УДК 576.8 : 547.963.3

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ФОТОАФФИННОЙ ХИМИЧЕСКОЙ  
МОДИФИКАЦИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ КОМПОНЕНТОВ  
СТРЕПТОМИЦИНСВЯЗЫВАЮЩЕГО ЦЕНТРА  
РИБОСОМ *E. COLI* MRE-600

*Гиршович А. С., Бочкарева Е. С.,  
Овчинников Ю. А.*

*Институт белка Академии наук СССР, г. Пушкино,  
Московская область*

При реакции стрептомицина с 2-нитро-4-азидобензоилгидразидом и последующем восстановлении  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  получен  $^3\text{H}$ -меченый фотоактивируемый аналог антибиотика. Аналог сохраняет функциональную активность исходного стрептомицина по двум критериям: 1) он связывается только с 30S-субчастицей рибосом, 2) ингибирует бесфакторную («неэзиматическую») стимулируемую *n*-хлормеркурибензоатом poly(U)-зависимую систему трансляции [1].

При облучении видимым светом смеси аналога стрептомицина с изолированными 30S- или 50S-субчастицами рибосом он ковалентно связывается преимущественно с 30S-субчастицей. Облучение же смеси аналога с целой 70S-рибосомой приводит к равномерному распределению ковалентно связанной метки между субчастицами. Сопоставление полученных эффектов позволяет заключить, что в рибосоме аналог стрептомицина, по всей вероятности, локализуется в зоне контакта субчастиц.

В 30S-субчастице аналог атакует в основном белковый компонент (более 95% всей ковалентно связанной метки). Белки, меченные при фотореакции, идентифицированы как S7 (основной), S14 (дополнительный) и S16/S17 (минорный).

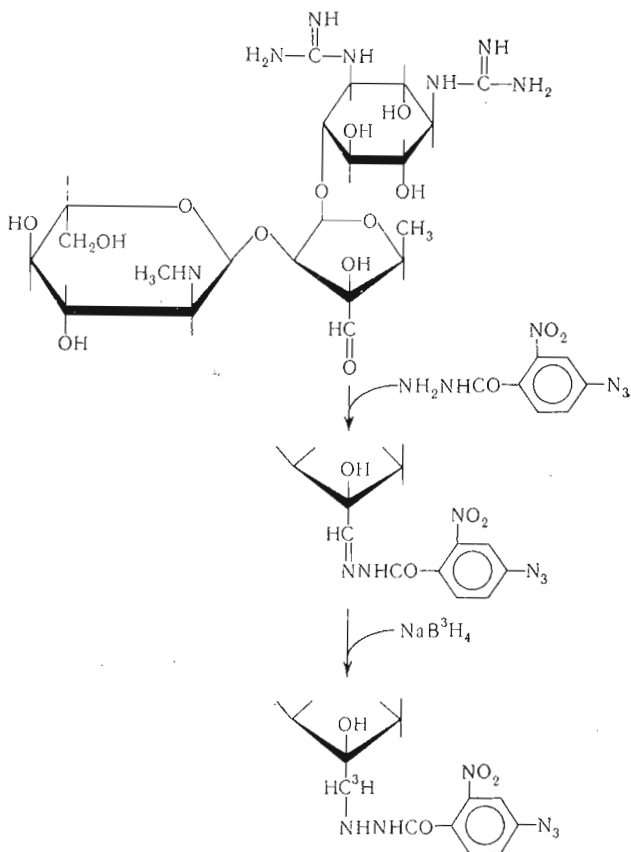
Стрептомицин является важнейшим антибиотиком, действующим на уровне трансляции: в белоксинтезирующей системе он ингибирует полипептидный синтез и вызывает ложное кодирование (miscoding).

К настоящему времени накоплено достаточно сведений о действии стрептомицина. Применяемые различными авторами подходы позволили идентифицировать ряд компонентов 30S-субчастицы как полинуклеотидной, так и белковой природы, важных для функционирования антибиотика (см., например, [2—9]). Однако до сих пор остается неизвестным конкретное место локализации стрептомицина на рибосоме.

В данном сообщении описан синтез фотоактивируемого аналога стрептомицина и приведены результаты применения его для аффинной модификации и идентификации компонентов стрептомицинсвязывающего центра рибосом.

*Синтез и функциональная активность фотоаналога  
стрептомицина*

При синтезе фотоактивируемого аналога стрептомицина (см. схему) мы исходили из следующих предпосылок:



а) возможность модификации стрептомицина по альдегидной группе без инактивации его функции (например, восстановление до дигидропроизводного);

б) количественность реакции альдегидной группы с гидразидами карбоновых кислот;

в) легкость восстановления двойной  $\text{C}=\text{N}$ -связи в получаемом гидразоне боргидридом натрия, что дает возможность синтезировать аналог стрептомицина в радиоактивном варианте с использованием  $\text{NaB}^3\text{H}_4$ ; специальный эксперимент показал интактность азидной группы (полоса  $2100\text{ см}^{-1}$  в ИК-спектре) при такой обработке;

г) необходимость использования химически неспецифичной фотоактивируемой группировки типа ароматического азида; последний при облучении видимым светом образует радикал питрен, реагирующий с любой стерически близкой связью, вплоть до  $\text{C}-\text{H}$ -связи [10]. Этот подход, как уже отмечалось нами ранее [11], позволяет идентифицировать компоненты изучаемого функционального центра независимо от экспонирования в них вблизи аффинного реагента химически активных ( $\text{NH}_2$ -,  $\text{SH}$ - и пр.) групп.

Стереохимический анализ молекулы синтезированного аналога стрептомицина показал возможность модификации им компонентов стрептомицинообразующего центра или ближайшего окружения в радиусе вращения остатка ароматического азида, т. е.  $\sim 10\text{ \AA}$ . Минимальное расстояние от  $\text{N}_3$ -группы до ближайшей гуанидиновой группировки в молекуле аналога составляет  $\sim 4\text{ \AA}$ .

Функциональную активность аналога стрептомицина тестировали по двум критериям: специфичности связывания с 30S-субчастицей и ингибирующему эффекту на полипептидный синтез *in vitro* в присутствии синте-

**Специфичность связывания и фотореакции аналога стрептомицина с рибосомой или рибосомальными субчастицами *E. coli* MRE-600 \***

Частица S	Добавка		Связывание	Фотореакция
	название	концентрация, нмоль/мл	моль аналога/моль частицы	
30	—	—	0,34	0,11(0,003) **
30	Стрептомицин	200	0,03	—
30	Спермидин	200	0,32	—
50	—	—	0,03	0,03
70	—	—	0,28	0,09

\* Концентрации аналога стрептомицина и рибосомальных частиц *E. coli* — 17 и 2,4 нмоль/мл соответственно.

\*\* В скобках приведены данные, полученные без облучения (контроль).

тической матрицы. В качестве системы трансляции выбрана бесфакторная («неэнзиматическая») стимулируемая *n*-хлормеркурибензоатом poly(U)-зависимая система биосинтеза полифенилаланина [1], поскольку она более чувствительна к ингибирующему эффекту стрептомицина, чем обычная энзиматическая система [9, 12].

В таблице приведены результаты связывания аналога стрептомицина с изолированными рибосомальными субчастицами. Видно, что аналог связывается преимущественно с 30S-субчастицей, связывание с 50S-субчастицей незначительно. Специфичность связывания аналога с 30S-субчастицей подтверждается наличием ингибирования связывания при добавлении в инкубационную смесь нативного стрептомицина и отсутствием такого эффекта при добавлении полиамида спермидина. При изучении зависимости бесфакторного синтеза полифенилаланина от концентрации аналога в сравне-

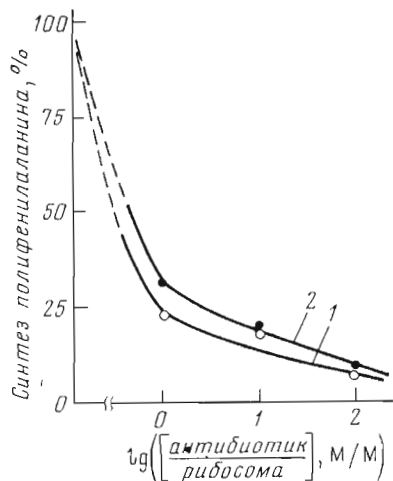


Рис. 1

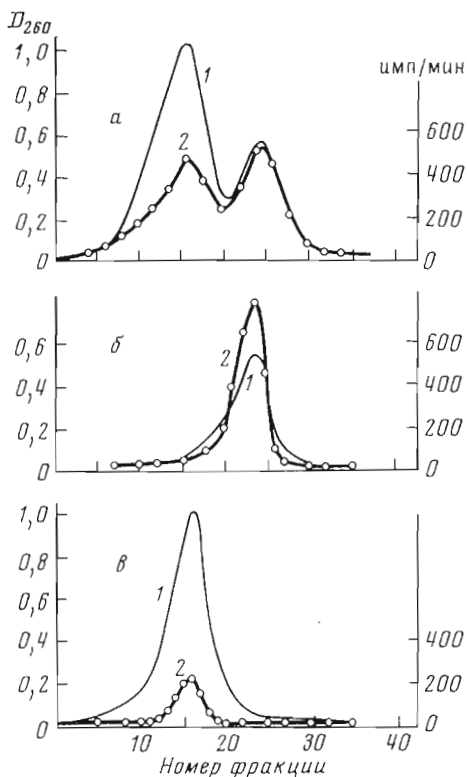


Рис. 2

Рис. 1. Влияние стрептомицина (1) и его аналога (2) на бесфакторный стимулируемый *n*-хлормеркурибензоатом poly(U)-зависимый биосинтез полифенилаланина

Рис. 2. Ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы (5—20%, в буфере Б) 70S-рибосом (а), 30S- (б) и 50S-субчастиц (в) после их реакции с аналогом стрептомицина: 1 —  $D_{280}$ , 2 — радиоактивность

нии с аналогичной зависимостью для нативного стрептомицина (рис. 1) показано, что оба вещества практически неразличимы по ингибирующему эффекту.

Таким образом, по выбранным критериям аналог стрептомицина сохраняет функциональную активность исходного антибиотика.

### *Специфичность реакции фотоаналога стрептомицина с рибосомальными субчастицами*

Ковалентное связывание фотоаналога стрептомицина с субчастицами при облучении инкубационной смеси тестировали по анализу радиоактивности, остающейся в рибосоме после осаждения пробы холодной 5%-ной трихлоруксусной кислотой (таблица). В контроле (без облучения) метка в осаждаемом трихлоруксусной кислотой материале практически отсутствовала. Из таблицы видно, что в выбранных условиях получения комплекса и фотореакции с 1 моль 30S-субчастицы ковалентно связывается до 0,11 моль аналога. Модификация 50S-субчастицы идет примерно в 3,5 раза слабее. Таким образом, фотореакция, как и образование комплекса, идет достаточно специфично по 30S-субчастице (см. также рис. 2, б и в).

При облучении комплекса фотоаналога с целой 70S-рибосомой аналог атакует обе субчастицы примерно с равной эффективностью (рис. 2, а). Ультрацентрифугирование в идентичных условиях 30S-субчастиц после их реакции с аналогом показало отсутствие 30S-димеров (рис. 2, б); следовательно, появление значительной радиоактивной метки в пике 50S-субчастиц в результате реакции аналога с 70S-рибосомой не является артефактом, связанным с возможной димеризацией меченых 30S-субчастиц, а обусловлено повышением сродства аналога стрептомицина к 50S-субчастице. Известно, что при образовании 70S-рибосомы может происходить конформационное изменение субчастиц (см., например, [13—15]). Однако его влияние на эффективность модификации субчастиц нам кажется маловероятным, так как нами используется химически неспецифичный атакующий агент (ароматический азид). Более верным представляется другое объяснение: полученный эффект — следствие локализации аналога в зоне контакта рибосомальных субчастиц. Этот вывод подтверждается приведенными ниже данными по идентификации белков, меченых в 30S-субчастице при фотореакции с аналогом стрептомицина.

### *Анализ продуктов реакции 30S-субчастиц с фотоаналогом стрептомицина*

Распределение ковалентно связанной с 30S-субчастицей метки между белковым и полинуклеотидным компонентами показало, что более 95% аналога стрептомицина локализовано в белке. Таким образом, по крайней мере пространственно ближайшие к азидной группе фрагменты молекулы стрептомицина контактируют с белком (фотореакция 30S- и 50S-субчастиц в составе 70S-рибосомы также идет практически только по белковому компоненту).

Хроматография  $^3\text{H}$ -меченого 30S-белка на фосфоцеллюлозе (рис. 3) свидетельствует о том, что метка распределена крайне неравномерно и сосредоточена преимущественно в виде одного основного, одного дополнительного и одного минорного пиков, элюирующихся 0,28; 0,39 и 0,41 M NaCl соответственно. Такое распределение также говорит о высокой специфичности реакции 30S-субчастицы с фотоаналогом стрептомицина.

Идентификация конкретных индивидуальных белков, меченых аналогом, представляет известные трудности, обусловленные наличием в молекуле аналога по крайней мере трех положительно заряженных групп. Поэтому следует ожидать, что при ковалентном присоединении фотоаналога к соответствующему белку резко изменится суммарный заряд последнего. Это должно привести к элюции белка на катионообменнике при

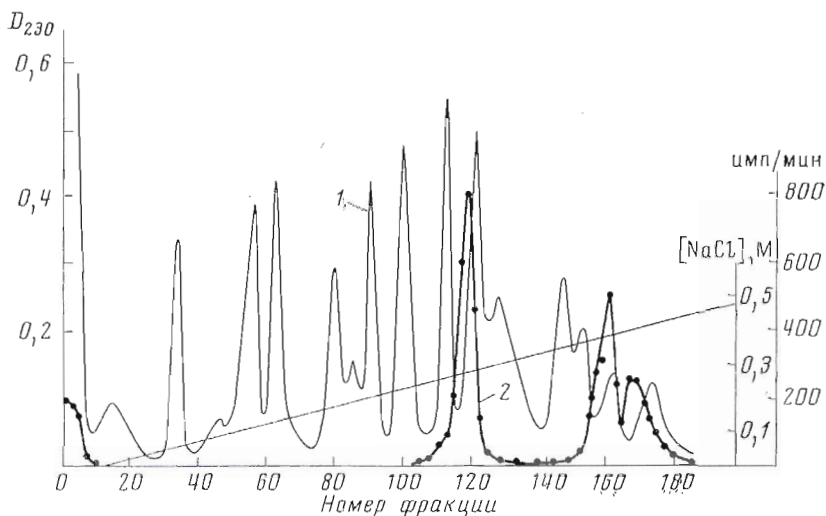


Рис. 3. Хроматография на фосфоцеллюлозе суммарного 30S-белка после реакции 30S-субчастиц с фотоаналогом стрептомицина: 1 —  $D_{230}$ , 2 — радиоактивность

большей ионной силе, т. е. к сдвигу вправо на хроматографическом профиле. По этой же причине неприменим для идентификации меченого белка и метод двумерного электрофореза в полиакриламидном геле.

Очевидно, для идентификации меченого белка необходимо отщепить ковалентно связанный с ним фотоаналог с регенерацией исходного белка.

При подборе условий отщепления фотоаналога мы исходили из того, что при удалении радиоактивной метки должен отщепляться весь антибиотик (см. формулу аналога на схеме). Анализ стабильности ковалентно связанной с суммарным 30S-белком радиоактивной метки показал, что при инкубации в 20—40%-ной уксусной кислоте при комнатной температуре за 2 ч удаляется 50% метки; полное удаление достигается примерно за 10 ч. Природа расщепляемой связи нами специально не анализировалась. Наиболее вероятен кислотный гидролиз гидразидной связи в молекуле фотоаналога, приводящий к полному отщеплению антибиотика. Свободный карбоксил бензойной кислоты, остающийся ковалентно связанной с белком, не может ощутимо изменить его подвижность [11, 16]. При последующей рехроматографии на фосфоцеллюлозе в стандартных условиях регенерированный белок должен вернуться на свое место на хроматографическом профиле, т. е. элюироваться при меньшей ионной силе, отделяясь от белков, не меченых при фотореакции. Очищенный таким образом белок можно идентифицировать как по его положению на хроматограмме, так и по поведению при двумерном электрофорезе в полиакриламидном геле. Однако нужно иметь в виду, что отщепление фотоаналога лишает возможности слежения за белком. Эта трудность, вообще говоря, преодолена обработкой белка перед рехроматографией формальдегидом в присутствии  $\text{NaB}^3\text{H}_4$ . Как известно, такая процедура восстановительного метилирования позволяет получить белок в радиоактивной форме при сохранении всех его нативных свойств [17, 18].

Таким образом, предлагается следующая схема идентификации белков, меченых аналогом стрептомицина: 1) отщепление аналога с регенерацией исходного белка; 2) мечение исследуемой фракции восстановительным метилированием в присутствии  $\text{NaB}^3\text{H}_4$ ; 3) рехроматография белков этой фракции на фосфоцеллюлозе в стандартных условиях и 4) идентификация искомого белка методом двумерного электрофореза в полиакриламидном геле.

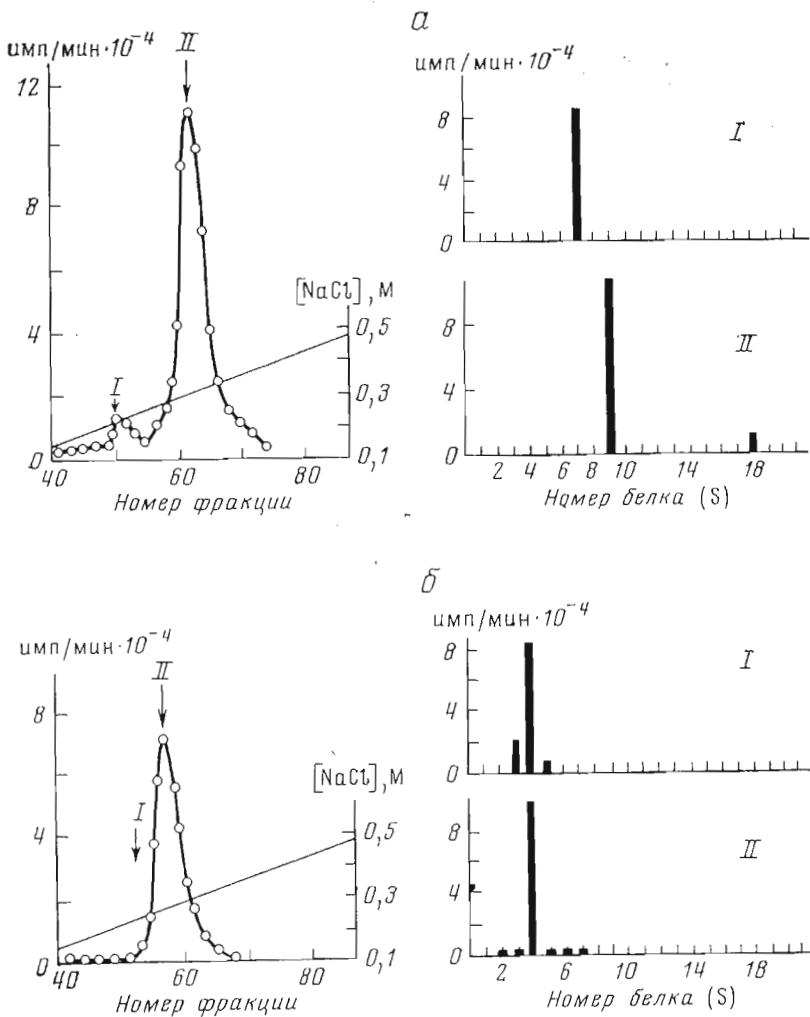


Рис. 4. Идентификация меченого белка основного пика (фракции 115—123, рис. 3) (а) и контрольного белка (фракции 112—114, см. рис. 3) (б). Слева — хроматография на фосфоцеллюлозе; справа — анализ белка пиков I и II двумерным электрофорезом в полиакриламидном геле

Согласно данным рис. 3, обработке по такой схеме были прежде всего подвергнуты продукты фракций 115—123 основного пика. Кроме меченого белка в этих фракциях, естественно, присутствует значительное количество белков, не связанных с аналогом, но обычно элюирующихся в этом районе. Рехроматография обработанных по вышеприведенной схеме белков (рис. 4, а) показала, что основная масса метки (пик II) элюировалась при той же ионной силе, что и исходный пик (примерно 0,28 M NaCl). Однако кроме нее появился минорный радиоактивный пик I, элюирующийся при более низкой ионной силе (примерно 0,21 M NaCl). Согласно вышеприведенным рассуждениям, он соответствует искомому белку, меченному при фотореакции, а по месту элюции с фосфоцеллюлозы — белку S7. На этом же рисунке (справа) приведены результаты анализа пиков I и II методом двумерного электрофореза в полиакриламидном геле [19]. Пик I содержит исключительно белок S7, что соответствует его положению на хроматографическом профиле. Пик II соответствует белку S9 с небольшой примесью белка S18. Поскольку белок S7 при хроматографии на фосфоцеллюлозе элюируется во фракциях 89—93 (рис. 3),

нам кажется маловероятным загрязнение им основного пика. Это заключение подкрепляется отсутствием в анализируемом веществе примеси белков S4 и S3, элюирующихся с максимумом во фракциях 112 и 100 (рис. 3) соответственно, т. е. значительно ближе к белку S9, чем белок S7.

Для окончательной уверенности в качестве контроля нами были взяты белки фракций 112—114 (рис. 3) и подвергнуты всем обработкам, выполненным для вещества основного пика. Как и следовало ожидать, контрольный образец при рехроматографии (рис. 4, б) элюировался при промежуточной ионной силе (0,25 M NaCl) и содержал в максимуме (пик II) чистый белок S4. Анализ фракций левого склона этого пика (отмечено стрелкой как I) показал в качестве основного белок S4 и примесь белка S3. В обоих случаях белок S7 в контроле отсутствовал.

Таким образом, основным белком, локализованным вблизи стрептомицинсвязывающего центра 30S-субчастицы или в самом центре, является белок S7.

Далее идентифицировали меченый белок дополнительного пика (фракции 155—165, рис. 3). Фракции этого пика были обработаны аналогично фракциям основного пика (см. выше), хроматографический профиль и результат электрофоретической идентификации представлены на рис. 5, а. Основная масса радиоактивной метки элюировалась при ионной силе  $\sim 0,39$  M NaCl (пик II) и содержала белок S21 с примесью белка S12. Появившийся небольшой пик слева (пик I) с максимумом элюции при 0,31 M NaCl содержал практически чистый белок S14. В качестве контроля были взяты фракции 151—154 (рис. 3), результаты их анализа приведены на рис. 5, б. Основными в контрольных фракциях оказались белки S12 и S19; белок S14 практически отсутствует.

Таким образом, дополнительным белком, локализованным вблизи стрептомицинсвязывающего центра 30S-субчастицы или в самом центре, является белок S14.

При идентификации меченого белка минорного пика (фракции 166—175, рис. 3) показано, что основная радиоактивность обнаруживается в пике II (0,4 M NaCl), который содержит преимущественно белок S20 (рис. 6). Небольшой пик I (искомый белок) содержал неразрешенную смесь белков S16 и S17. Причина столь значительного сдвига этих белков на хроматографическом профиле (исходная смесь S16 и S17 элюируется с максимумом во фракции 80, рис. 3) при их модификации фотоаналогом не ясна. Вероятно, это обусловлено особенностью распределения зарядов на поверхности этих белков. Остается также неясным вопрос о том, оба ли белка S16 и S17 модифицировались при фотореакции или только один из них, а метка в другом вызвана плохим разрешением этих белков при двумерном электрофорезе.

Полученные данные по идентификации белков, меченных в составе 30S-субчастицы при реакции с фотоактивируемым аналогом стрептомицина, позволяют заключить, что вблизи стрептомицинсвязывающего центра 30S-субчастиц или в самом центре экспонированы белки S7, S14 и S16/S17.

Результаты настоящего исследования можно представить в виде двух основных выводов: 1) стрептомицинсвязывающий центр локализован на поверхности 30S-субчастицы в зоне ее контакта с 50S-субчастицей; 2) в стрептомицинсвязывающем центре (или вблизи него) экспонированы белки S7, S14 и S16/S17.

Первый вывод легко объясняет способность стрептомицина стабилизировать 70S-ассоциат [20] и может служить важным свидетельством в пользу гипотезы, объясняющей ложное кодирование как следствие стабилизации этого ассоциата [21].

Идентификация перечисленных выше белков как компонентов стрептомицинсвязывающего центра или его ближайшего окружения представляет определенный интерес в плане понимания механизма функционирования этого антибиотика. В предыдущем нашем сообщении [11] было по-

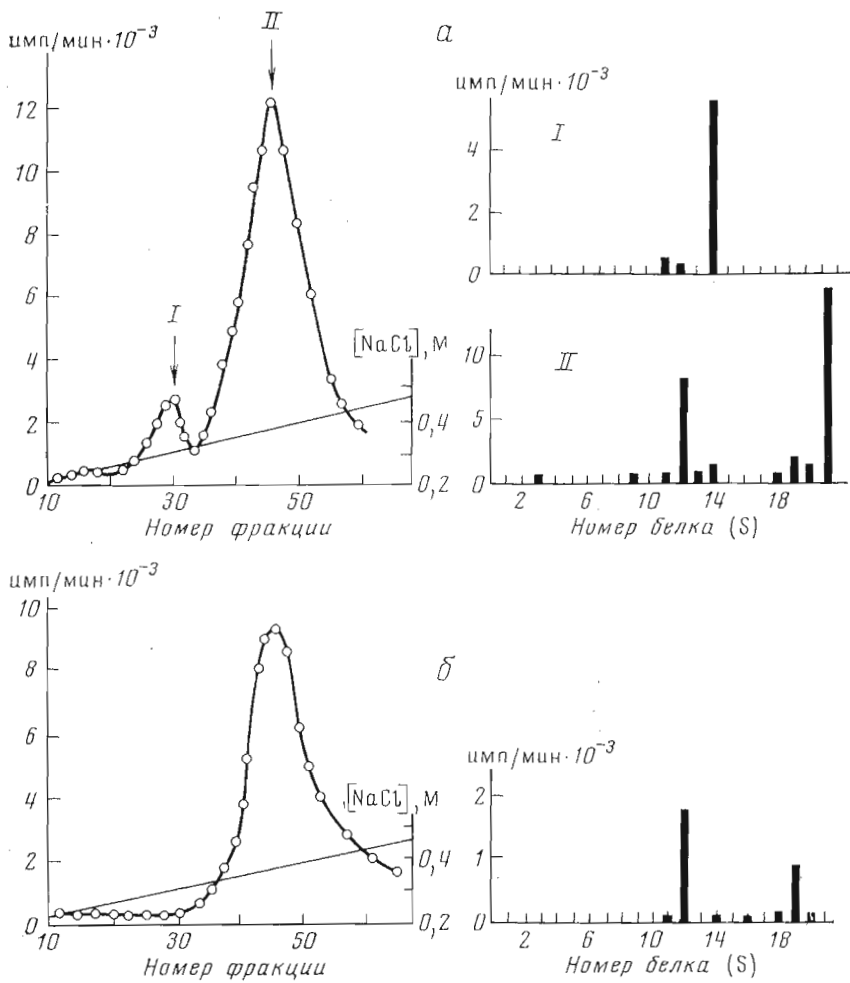


Рис. 5. Идентификация меченого белка дополнительного пика (фракции 155—165, см. рис. 3) (а) и контрольного белка (фракции 151—154, см. рис. 3) (б). Слева — хроматография на фосфоцеллюлозе; справа — анализ белка двумерным электрофорезом в полиакриламидном геле

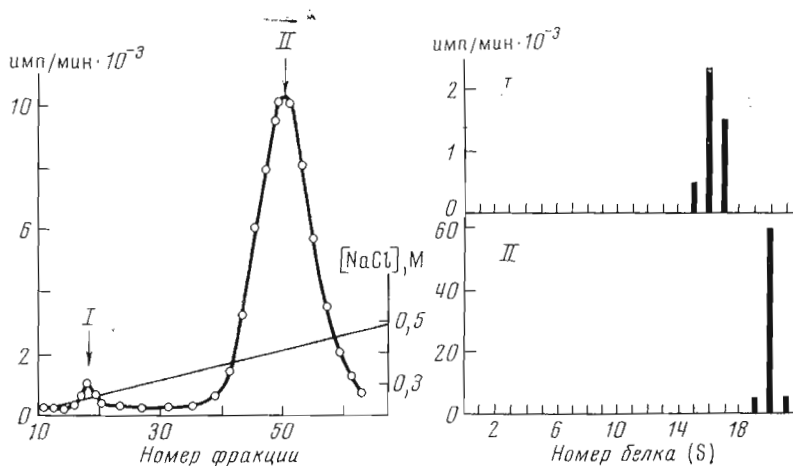


Рис. 6. Идентификация меченого белка минорного пика (фракции 166—175, см. рис. 3). Слева — хроматография на фосфоцеллюлозе; справа — анализ белка двумерным электрофорезом в полиакриламидном геле



казано, что белки S7, S14 и S3 расположены на поверхности 30S-субчастицы в районе локализации акцепторного конца тРНК и, в соответствии с выводами Рендел-Хазельбауэра и Курланда [22], входят в состав белков, формирующих так называемый А-участок. Поскольку два из этих белков (S7 и S14) входят в состав стрептомицинсвязывающего центра, логическим следствием такого сопоставления является вывод о значительном перекрытии, а возможно, и полном совпадении двух важнейших функциональных центров 30S-субчастицы — стрептомицинсвязывающего центра и А-участка.

### Экспериментальная часть

30S- и 50S-субчастицы рибосом *E. coli* MRE-600 любезно предоставлены Н. В. Белицкой. Стрептомицинсульфат — препарат фирмы «Calbiochem» (Швейцария).  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  — препарат фирмы «Amersham» (Англия), уд. акт. 0,4—4,0 Ки/ммоль. Формальдегид, 40%-ный раствор, ч.д.а., перед использованием кипятили в течение нескольких часов в запаянной ампуле. Фосфоцеллюлоза Mannex P — препарат фирмы «Schwarz — Mann» (США).

Используемые буферы: А — 10 мМ трис-НСl (рН 7,2), 250 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (или  $\text{KCl}$ ), 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; Б — 10 мМ трис-НСl (рН 7,2), 500 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; В — 20 мМ трис-НСl (рН 7,5), 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; Г — 50 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (рН 6,5), 12 мМ метиламиц, 3 мМ дитиотреит, 6 мМ мочевины; Д — 100 мМ борат (рН 9), 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 3 мМ дитиотреит, 4 мМ гуанидинхлорид.

*Фотоактивируемый  $^3\text{H}$ -меченый аналог стрептомицина.* К раствору 10 мкмоль стрептомицина в 1,3 мл 0,05 М фосфатного буфера (рН 6,7) прилили раствор 20 мкмоль 2-нитро-4-азидобензоилгидразида в 0,4 мл свежеперегнанного диоксана и инкубировали в темноте 3 ч при комнатной температуре. Затем реакционную смесь охладили до 0° и добавили 100 мкмоль  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  (уд. акт. 400 мКи/ммоль). После инкубации в течение 1 ч при 0° продукт осадил и промыли этанолом, растворили в 0,01 М ацетате калия (рН 5) и нанесли на колонку с СМ-целлюлозой (1 × 5 см). Колонку промыли этим же буфером до отсутствия радиоактивности и продукт элюировали в минимальном объеме 0,5 М  $\text{KCl}$ . Полученный аналог хранили в этом же растворе в замороженном виде при -20°. Чистоту препарата проверяли с помощью ТСХ на силикагеле («Silufol», СССР) в этаноле ( $R_f$  аналога — 0,  $R_f$  2-нитро-4-азидобензоилгидразида — 0,5,  $R_f$   $\text{NaB}^3\text{H}_4$  и продуктов его гидролиза — 0,9—1,0) и по электрофорезу на бумаге FN-15 (ГДР) в 0,03 М трис-НСl (рН 7,5), 900 В, 2 ч (подвижность аналога — 1 относительно подвижности пикриновой кислоты). В обоих случаях радиоактивность наблюдали в виде одного пятна, совпадающего с пятном, окрашенным по Сакагучи (тест на стрептомицин) и поглощающим в УФ-свете (тест на остаток бензойной кислоты). При хроматографии на фосфоцеллюлозе в условиях Харди и др. [23] аналог стрептомицина элюировался в виде индивидуального симметричного пика, не осаждаемого 5%-ной трихлоруксусной кислотой, при 0,28 М  $\text{NaCl}$ .

Концентрацию фотоаналога в растворе определяли по модифицированному методу Сакагучи [24] с использованием для построения калибровочной кривой исходного стрептомицина. Удельная активность препарата около  $2 \cdot 10^4$  имп/мин/ммоль (счет в тритон-толуольном сцинтилляторе на счетчике «Beckman LS-100», эффективность счета ~70%).

*Связывание фотоаналога с рибосомальными субчастицами.* Состав инкубационной смеси (0,1 мл) в буфере А [6]: 0,24 нмоль 30S- или 50S-субчастиц (в случае целой рибосомы применяли эквимлярную смесь субчастиц) и инкубировали перед добавлением фотоаналога 20 мин при 25° и 1,7 нмоль фотоаналога. Смесь инкубировали 20 мин при 25°, затем разбавляли 3 мл холодного буфера А, фильтровали через нитроцеллюлозный

ультрафильтр UFUS («Chemapol», ЧССР) и промывали ( $2 \times 4$  мл) этим же буфером. Высушенные ультрафильтры просчитывали в толуольном сцинтиллаторе.

*Фотореакция.* Инкубационную смесь после стадии связывания помещали в термостатированную кювету и облучали лампой накаливания 400 Вт (излучатель — диапроектор Ленинградского электротехн. ин-та) в течение 2 ч при  $2-4^\circ$ . Затем смесь осаждали холодной 5%-ной трихлоруксусной кислотой и быстро фильтровали через нитроцеллюлозный ультрафильтр AUFS («Chemapol», ЧССР), промывали ( $5 \times 5$  мл) холодной 5%-ной трихлоруксусной кислотой, 2 мл 50%-ного этанола, сушили и просчитывали в толуольном сцинтиллаторе.

В случае фотореакции с 70S-рибосомой смесь после облучения диализовали в течение ночи при  $4^\circ$  против 400 объемов буфера Б и центрифугировали в градиенте сахарозы 5—20% в этом же буфере, как описано ранее [11]. Радиоактивность во фракциях 50S- и 30S-субчастиц определяли после осаждения проб холодной 5%-ной ТХУ, как описано выше.

*Стимулируемый п-хлормеркурибензоатом poly(U)-зависимый бесфакторный («неэнзиматический») биосинтез полифенилаланина* проводили как описано Гавриловой и Спириным [1].

*Выделение суммарного  $^3\text{H}$ -меченого 30S-белка.* После стадии облучения смесь, содержащую фотоаналог и 30S-субчастицу, осаждали равным объемом этанола, суспендировали в буфере В до концентрации рибосом 20—30 мг/мл, добавляли равный объем 4 М LiCl в 8 М мочеvine и инкубировали при  $-10^\circ$  в течение 50—60 ч. Осадок РНК отделяли центрифугированием. Распределение ковалентно связанной метки между РНК и белком оценивали осаждением соответствующих проб из растворенного осадка и супернатанта холодной 5%-ной трихлоруксусной кислотой, как описано выше. Супернатант пропускали через колонку с сефадексом G-25, промытым предварительно буфером Г, для удаления свободного фотоаналога и перевода белка в буфер для последующей хроматографии. Фракции, содержащие белок, объединяли.

*Хроматография суммарного 30S-белка на фосфоцеллюлозе* (рис. 3). Хроматографию проводили при  $4^\circ$  по Харди и др. [23]: колонка  $0,9 \times 60$  см, линейный градиент 0—0,5 М NaCl в буфере Г, объем градиента 950 мл, скорость элюции 20 мл/ч, объем фракции 5 мл. Количество наносимого белка 35 мг. В каждой фракции элюата определяли оптическую плотность 230 нм и радиоактивность (осаждением проб холодной 5%-ной трихлоруксусной кислотой в присутствии носителя — альбумина).

*Отщепление фотоаналога от меченого белка* осуществляли добавлением к соответствующей фракции ледяной  $\text{CH}_3\text{COOH}$  до 40% и инкубацией в течение ночи при комнатной температуре. Затем белок диализовали на холоду против 10%-ной  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и лиофилизовали.

*Восстановительное метилирование* проводили как описано ранее [17, 18]:  $\sim 1$  мг лиофильно высушенного белка растворяли в 0,3 мл буфера Д и после охлаждения при  $0^\circ$  добавляли 50 мкл 1%-ного формальдегида. Через 30—40 с добавляли  $\sim 0,2-1$  мкмоль  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  (уд. акт. 4 Ки/ммоль) в 50 мкл диметилформамида, инкубировали 5—10 мин, затем добавляли 10 мкмоль немеченого  $\text{NaBH}_4$  и инкубировали еще 1—2 ч. По окончанию стадии восстановления смесь подкисляли муравьиной кислотой до pH 3 и после инкубации на холоду в течение 30 мин диализовали против 10%-ной  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и лиофилизовали.

*Рехроматография белков после восстановительного метилирования.* Лиофилизованный белок растворяли в буфере Г и хроматографировали на фосфоцеллюлозе по Харди и др. [23], как описано выше. Основной пик и его контроль (фракции 115—123 и 112—114 соответственно, см. рис. 3): колонка  $0,3 \times 50$  см, линейный градиент 0—0,5 М NaCl, объем градиента 90 мл, скорость элюции 1,5 мл/ч, объем фракции 1 мл, проба на счет радиоактивности из каждой фракции 10 мкл (рис. 4). Дополнительный и минор-

ный пики и их контроль (фракции 155—165, 166—175 и 151—154 соответственно, см. рис. 3): колонка  $0,6 \times 60$  см, линейный градиент  $0,2—0,5$  М NaCl, объем градиента 250 мл, скорость элюции 7,6 мл/ч, объем фракции 3,5 мл, проба за счет радиоактивности из каждой фракции 50—100 мкл (рис. 5,6).

Двумерный электрофорез в полиакриламидном геле проводили по Кальтшмидту и Виттману [19]. К  $^3\text{H}$ -меченому белку ( $5 \cdot 10^4—9 \cdot 10^5$  имп/мин) добавляли  $\sim 1$  мг суммарного 30S-белка в качестве носителя и сахарозу до 20—30%. Пятна, окрашенные амидом черным, вырезали, измельчали и инкубировали при  $50^\circ$  в течение 20 ч в 0,5 мл 0,5%-ного додецилсульфата натрия. Затем добавляли 5 мл тритон-толуольного сднтиллятора и считали радиоактивность.

Авторы приносят глубокую благодарность А. С. Спирину за иницирование и активное участие в обсуждении настоящего сообщения, а также Л. П. Волюнкиной за проведение двумерного электрофореза в полиакриламидном геле.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Gavrilova L. P., Spirin A. S. (1971) FEBS Lett., 17, 324—326.
2. Ozaki M., Mizushima S., Nomura M. (1969) Nature, 222, 333—339.
3. Chang F. N., Flaks J. G. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 67, 1321—1328.
4. Deusser E., Stoffler G., Wittmann H. G. (1970) Mol. and Gen. Genet., 109, 298—302.
5. Gorini L. (1974) Nature, 234, 261—264.
6. Schreiner G., Nierhaus K. H. (1973) J. Mol. Biol., 81, 71—82.
7. Garvin R. T., Biswas D. K., Gorini L. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 3814—3818.
8. Lelong J. C., Gros D., Gros F., Bollen A., Maschler R., Stöffler G. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 248—252.
9. Gavrilova L. P., Koteliansky V. E., Spirin A. S. (1974) FEBS Lett., 45, 324—328.
10. Knowles J. R. (1972) Accounts Chem. Res., 5, 155—160.
11. Girshovich A. S., Bochkareva E. S., Kramarov V. M., Ovchinnikov Yu. A. (1974) FEBS Lett., 45, 213—217.
12. Костяшкина О. Е., Асатрян Л. С., Гаврилова Л. П., Спири А. С. (1975) Молекулярн. биология, 9, 775—782.
13. Michalski C. J., Sells B. H. (1975) Eur. J. Biochem., 52, 385—389.
14. Litman D. J., Lee C. C., Cantor C. R. (1974) FEBS Lett., 47, 268—271.
15. Chang F. N. (1973) J. Mol. Biol., 78, 563—568.
16. Czernilofsky A. P., Collatz E. E., Stöffler G., Kuechler E. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 230—234.
17. Moore G., Crichton R. R. (1973) FEBS Lett., 37, 74—78.
18. Moore G., Crichton R. R. (1974) Biochem. J., 143, 607—612.
19. Kaltschmidt E., Wittmann H. G. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 67, 1276—1282.
20. Лишневецкая Е. Б., Гельфанд В. И., Спири А. С. (1971) Докл. АН СССР, 199, 712—714.
21. Spirin A. S. (1972) in Molecular Mechanisms of Antibiotic Action on Protein Biosynthesis and Membranes (Muñoz E., García-Ferrandiz F., Vazquez D., eds.), Elsevier Sci. Publ. Co., pp. 11—27, Amsterdam — London — New York.
22. Randall-Hazelbauer L. L., Kurland C. G. (1972) Mol. and Gen. Genet., 115, 234—242.
23. Hardy S. J. S., Kurland C. G., Voynow P., Mora G. (1969) Biochemistry, 8, 2897—2905.
24. Tomlinson G., Viswanatha T. (1974) Anal. Biochem., 60, 15—24.

Поступила в редакцию  
25.II.1976

APPLICATION OF PHOTO-AFFINITY CHEMICAL MODIFICATION FOR  
IDENTIFICATION OF THE COMPONENTS OF THE STREPTOMYCIN-BINDING  
CENTER OF RIBOSOMES *E. COLI* MRE-600

GIRSHOVICH A. S., BOCHKAREVA E. S., OVCHINNIKOV Yu. A.

*Institute of Protein Research, Academy of Sciences  
of the USSR, Pushchino*

The  $^3\text{H}$ -labeled photo-activated streptomycin analog is obtained as a results of the streptomycin reaction with 2-nitro-4-azidobenzoylhydrazide and a following reduction with  $\text{NaB}^3\text{H}_4$ . The analog retains the functional activity of the initial antibiotic by the two criteria: 1) it binds only with the 30S subunit of ribosomes, 2) it inhibits the factor-free («non-enzymatic») PCMB-stimulated poly(U)-dependent system of translation. On visible light exposure of the analog mixture with 30S or 50S ribosome subunits, the analog covalent binding occurs mainly to the 30S subunit. Irradiation of the analog mixture with the whole 70S ribosomes leads to a uniform distribution of a covalently bound label among the subunits. A comparison of the effects observed suggests a possible location of the analog at the interface of the ribosomal subunits. In the 30S subunit the streptomycin analog attacks mainly the protein component (more than 95% of all the covalently bound label). The proteins labeled under photo-reaction are identified as S7 (main), S14 (additional) and S16/S17 (minor).

---