



УДК 547.963.32

**АФФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ 16S РНК В СОСТАВЕ
РИБОСОМ *E. COLI* АНАЛОГОМ ГЕПТАУРИДИЛАТА,
НЕСУЩИМ НА 3'-КОНЦЕ ХИМИЧЕСКИ АКТИВНУЮ ГРУППУ****Карнова Г. Г., Кобец Н. Д., Силина С. А.,
Годовиков А. А.***Институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск*

Исследовано алкилирование 16S РНК в составе рибосом *E. coli* аналогом мРНК — 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилден]овым производным гептауридилата. Установлено строение продуктов алкилирования. Обнаружено, что основными точками модификации в 16S РНК являются фосфодиэфирные группы и N-7 гуанина. Показано, что при модификации фосфодиэфирных групп в 16S РНК образуются фосфотриэфиры, которые легко гидролизуются в слабокислых растворах с образованием 4-(N-2-оксиэтил-N-метиламино)бензальдегида. В нейтральных и слабощелочных растворах гидролиз фосфотриэфиров сопровождается расщеплением 16S РНК в точках модификации, на расстоянии 480 ± 40 и 110 ± 20 нуклеотидов от 3'-конца.

В последнее время появилось много данных, указывающих на прямое участие рРНК в организации функциональных центров рибосомы. Известно, что 16S РНК непосредственно взаимодействует с мРНК, тРНК и белковыми факторами трансляции [1, 2].

Целью данной работы является локализация участков 16S РНК из рибосом *E. coli*, примыкающих к мРНК-связывающему центру, с помощью аффинной модификации рибосом алкилирующим аналогом мРНК — бензилденовым производным гептауридилата.

Ранее было показано, что RCl-производные олигонуклеотидов стимулируют связывание кодонспецифичной аминоацил-тРНК с рибосомами и могут быть использованы в качестве реакционноспособных аналогов мРНК [3, 4]. Модификация рибосом RCl-производным гептауридилата в составе тройного комплекса «рибосома — [^{14}C] (pU)₆pUCHRCl — тРНК» приводит к алкилированию в основном 30S субчастиц [4]. За 24 ч при 25° С около 40% связавшегося в комплекс реакционноспособного реагента ковалентно присоединялось к рибосомам. Степень модификации 16S РНК, выделенной из 30S субчастиц фенольной экстракцией, составляла 0,1 моль реагента на 1 моль 16S РНК.

Для анализа точек модификации 16S РНК при pH 4 и 40° С разрушали ацетальную связь алкилирующей группы с олигонуклеотидным звеном. После кислотного гидролиза РНК осаждали спиртом. В результате такой

Принятые сокращения: (pU)₆pUCHRCl — 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензилден]гептауридилат; RGua, RAde и RCp — β-[N-метил-N-(4-формилфенил)амино]этилгуанин, -аденин и -3'(2')-цитидиловая кислота; ROH — 4-(N-2-оксиэтил-N-метиламино)бензальдегид.

УФ-спектры продуктов алкилирования 16S РНК в составе рибосом с помощью (pU)₆pUCHRCI

Вещество	pH	$\lambda_{\text{макс}}$	$\lambda_{\text{мин}}$	$D_{350}^{\text{pH } 2} / D_{350}^{\text{pH } 2}$
(II)	2	245, 345	222, 268	1,80
	7	245, 350	220, 272	
	13	245, 350	220, 282	
(IV)	7	244, 350	220, 270	1,90
RON [5, 6]	7	245, 352	220, 270	1,90
RpRib [8]	2	245, 345	270	1,88
	7	245, 350	275	
	13	245, 350	285	

Таблица 2

Идентификация продуктов алкилирования 16S РНК в составе рибосом гентауридилатом (pU)₆pUCHRCI

Вещество	R_f в системах			
	А	Б	В	Г
(I)	0,42	0,68	0,42	0,63
(II)	0,84	0,90	0,86	0,83
(III)	0	0		0
(IV)	0,86	0,88		0,86
70-RGua	0,42	0,68	0,42	0,63
3-RCp [5]	0,39	0,55	0,52	
1-RAde [5]		0,77	0,61	
RON [6]	0,86	0,87		0,88
RpRib [8]	0,85	0,90		0,88
(pU) ₇	0	0	0	0

обработки большая часть радиоактивной метки (68%) отщеплялась от 16S РНК и оставалась в супернатанте. Это свидетельствовало о наличии в модифицированной 16S РНК кислотно-лабильных участков.

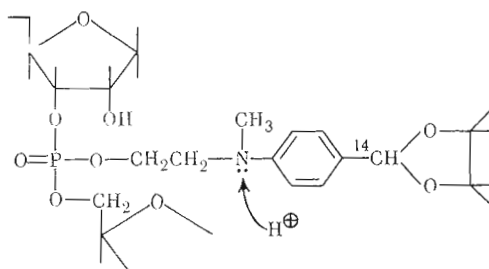
Осажденную спиртом РНК гидролизовали 1 н. HCl при 100° С. Гидролизат хроматографировали на бумаге в трех системах растворителей и хроматографические свойства полученных веществ сравнивали со свойствами соединений, описанных ранее [5–7]. В некоторых случаях снимали УФ-спектры и сопоставляли их со спектрами заведомых образцов (табл. 1). При хроматографии на бумаге продуктов гидролиза алкилированной 16S РНК выделено два вещества, гомогенных в трех системах растворителей (табл. 2). Вещество (I) (60%) отнесено к 7-RGua [5] на основании его хроматографической подвижности в трех системах растворителей. В гидролизате также обнаружено вещество (II) (40%), которое по своей хроматографической подвижности в трех системах и УФ-спектрам совпадает с RON [6, 7].

Однако, если в РНК алкилированы фосфодиэфирные группы, в условиях кислотного гидролиза нельзя исключить образования β-[N-метил-N-(4-формилфенил)амино]этилового эфира 3'(2')-рибозофосфата. Как показано ранее [8], хроматографическая подвижность на бумаге и УФ-спектр продукта жесткой кислотной обработки аналогичного эфира 5'-рибозофосфата (RpRib) совпадают с таковыми для RON (табл. 1 и 2).

Для и дентификации продуктов кислотно-лабильной модификации мы анализировали супернатант, отделенный после осаждения спиртом алкилированной 16S РНК, выдержанной при рН 4. Хроматографией на бумаге в трех системах растворителей (табл. 2) было обнаружено вещество (III), стоящее на старте. На основании положения на профиле элюции при ионообменной хроматографии оно отнесено к (pU)₇. Другое вещество (IV), обладающее высокой подвижностью, было отнесено к ROH. Появление ROH, вероятнее всего, связано с гидролизом фосфотриэфиров, которые образуются в результате алкилирования фосфодиэфирных групп 16S РНК в составе рибосом.

Известно, что фосфотриэфиры РНК являются лабильными соединениями и их гидролиз в зависимости от условий сопровождается либо расщеплением РНК в точках модификации с образованием ее фрагментов со стабильными 3'(2')-концевыми алкилфосфатными группами, либо выделением соответствующего спирта. Предполагают, что разрыв фосфотриэфирных связей сопровождается образованием промежуточных 2',3'-циклофосфатов [9]. Сингер и др. [9, 10] показали, что межнуклеотидная фосфодиэфирная связь в триэфирах расщепляется в нейтральных или слабощелочных средах, а в слабокислых растворах преимущественно происходит отщепление спирта.

В 16S РНК, модифицированной с помощью (pU)₆pUCHRCl в составе рибосом, при рН 4 более 85% фосфотриэфиров гидролизуется с образованием ROH. Это связано, по-видимому, с протонированием атома азота в ароматическом заместителе:



На основании литературных данных можно было ожидать, что расщепление 16S РНК по модифицированным гелтауридилатом (pU)₆pUCHRCl фосфодиэфирным группам происходит уже в процессе алкилирования рибосом. В результате расщепления РНК будут образовываться фрагменты как с 3'(2')-концевыми алкилфосфатными группами, так и с 3'-концевыми гидроксильными группами. Чтобы зарегистрировать фрагментацию РНК, мы на 3'-конец алкилированной 16S РНК вводили ³²P-метку (алкил-[3'-³²P]-16S РНК) с помощью РНК-лигазы Т4 и ³²pСr. Последний получали из Ср путем фосфорилирования [γ -³²P] АТФ в присутствии полинуклеотидкиназы.

Таковую же метку вводили в контрольную 16S РНК, выделенную из той же партии рибосом, что использовали для модификации, прошедших через все стадии обработки, как и модифицированные рибосомы. Алкилированную и контрольную 16S РНК, меченные ³²P по 3'-концам, анализировали электрофорезом в агарозо-полиакриламидном геле. Электрофорез 16S РНК, не подвергавшейся никаким обработкам, дает одну узкую полосу (рис. 1а). Контрольная [³²P]РНК образует в геле несколько уширенную полосу. При сканировании и измерении радиоактивности геля наблюдается несимметричный пик, соответствующий 16S РНК, с плечом в области 900±80 нуклеотидов (рис. 1а). Обработка контрольной [³²P]-16S РНК при рН 4 и 9 приводит к почти полному исчезновению этого плеча (рис. 1б, в). После электрофореза в геле алкил-[3'-³²P]-16S РНК дает по радиоактивности четыре пика (рис. 2а).

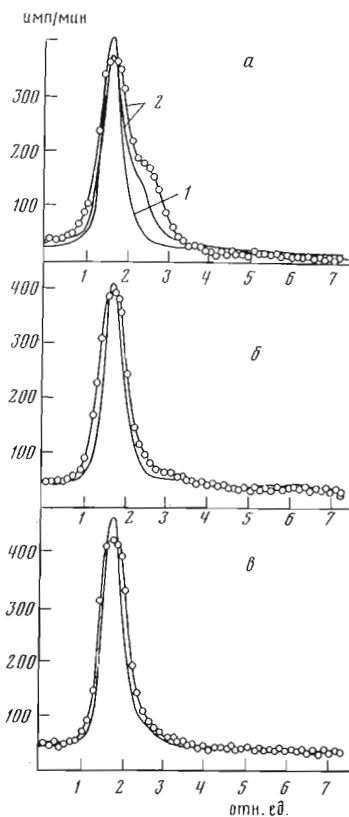


Рис. 1

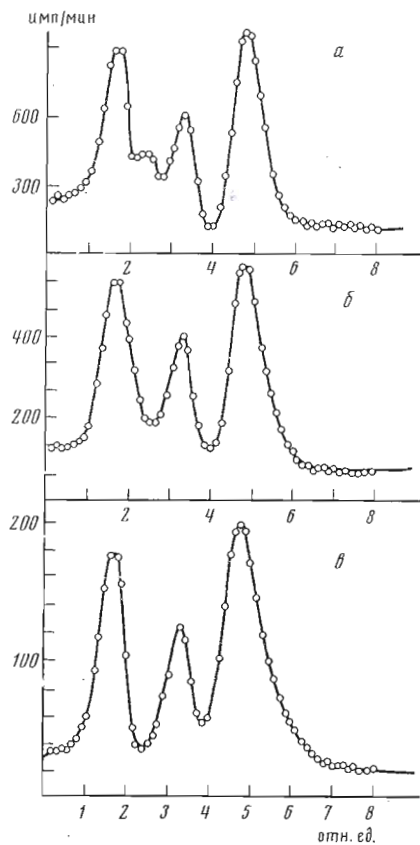


Рис. 2

Рис. 1. Электрофорез контрольной 16S РНК в агарозо-полиакриламидном геле (2,2%): а — немеченой 16S РНК (использованной в качестве стандарта) (1) $[3'-^{32}\text{P}]$ -16S РНК (2); б — $[^{32}\text{P}]$ 16S РНК, выдержанной 1 ч при pH 4 и 40°C ; в — $[^{32}\text{P}]$ 16S РНК, выдержанной 20 мин при pH 9 и 20°C . D_{260} — радиоактивность

Рис. 2. Электрофорез в агарозо-полиакриламидном геле (2,2%) алкил- $[3'-^{32}\text{P}]$ 16S РНК: а — исходной; б — выдержанной 1 ч при pH 4 и 40°C ; в — выдержанной 20 мин при pH 9 и 20°C

Первый пик соответствует целой 16S РНК, второй — фрагменту, присутствующему в пике контрольной $[3'-^{32}\text{P}]$ -16S РНК в виде плеча. Наряду с ними появляются четко выраженные пики в области 480 ± 40 и 110 ± 20 нуклеотидов. Электрофорез алкил- $[3'-^{32}\text{P}]$ -16S РНК после обработки при pH 4 и 9 не приводит к появлению дополнительных пиков (рис. 2б, в). Однако, как и в контрольном опыте, исчезает пик, соответствующий фрагменту длиной 930 ± 80 нуклеотидов (длины фрагментов оценивали по калибровочному графику, приведенному на рис. 3).

Сопоставление результатов электрофореза контрольной и алкилированной 16S РНК позволяет заключить, что появление фрагментов с длиной 480 ± 40 и 111 ± 20 нуклеотидов с 3'-конца связано с модификацией 16S РНК по фосфодиэфирным группам. Около 15% образующихся фосфотриэфиров гидролизуются в процессе алкилирования рибосом и при дальнейшей их обработке (pH 7,5).

Интересно, что химическая направленность алкилирования бензилиденовыми производными олигонуклеотидов свободной РНК и 16S РНК в составе рибосом резко различается. При модификации рРНК в комплексе с бензилиденовыми производными олигоаденилатов алкилируются в рав-

ной степени гуанин, цитозин и аденин вблизи 5'-концов участков связывания реагента [5]. При алкилировании 16S РНК в составе рибосом с помощью $(pU)_6pUCHRCl$ основная доля модификации (~80%) приходится на фосфодиэфирные группы и только ~20% реагента расходуется на алкилирование гуанином.

Наличие по крайней мере двух точек модификации, достаточно разнесенных по длине 16S РНК, позволяет предположить, что эти участки, расположенные на расстоянии 480 ± 40 , 110 ± 20 нуклеотидов с 3'-конца, сближены в мРНК-связывающем участке рибосомы.

По современным представлениям мРНК-связывающий участок рибосом находится в области контакта между рибосомными субчастицами. Прямым экспериментальным свидетельством этому служат данные по специфичной химической модификации 50S рибосомных субчастиц достаточно короткими аналогами мРНК [4]. Следовательно, точки модификации 16S РНК аналогами матрицы должны принадлежать зоне контактной поверхности 30S рибосомной субчастицы.

Обнаруженный нами участок модификации 16S РНК на расстоянии 110 ± 20 нуклеотидов с 3'-конца входит в состав домена РНК (с 1350-го по 1541-й нуклеотид с 5'-конца), который, согласно модели Ноллера [11], соответствует области контакта с 50S рибосомной субчастицей, ответственной за инициацию белкового синтеза.

Кроме того, по данным Оффенганда и др. [12], этот участок РНК сшивается с антикодоном тРНК^{Val}, т. е. относится к области кодон-антикодонного взаимодействия, что хорошо согласуется с нашими данными.

Участок модификации 16S РНК на расстоянии 480 ± 40 нуклеотидов с 3'-конца включает гуанины 1063/1067 (нумерация с 5'-конца РНК), подвергаемые модификации кетоксалем в составе 30S, но не 70S рибосом [11]. Следовательно, эта область РНК, возможно, также расположена в зоне контакта рибосомных субчастиц.

Экспериментальная часть

Рибосомы *E. coli* MRE-600, полиуридиловая кислота, гептауридиловая кислота, препарат суммарной тРНК *E. coli* MRE-600 — продукты СКТБ БАВ (Новосибирск). [¹⁴C]-L-Фенилаланин (уд. акт. 220 МКи/ммоль) — производства ЧССР, [³²P]АТФ (уд. акт. 1500—2000 Ки/ммоль) — фирмы «Amersham» (Англия). 2',3'-О-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензильден]овое производное гептауридилата, $(pU)_6pUCHRCl$, с активностью 20 МКи/ммоль синтезировано по [13].

Для хроматографии применяли бумагу FN-1 (ГДР) и следующие системы растворителей: А — изопропанол — аммиак — вода (7 : 1 : 2); Б — изопропанол — вода (6 : 4); В — изопропанол — конц. HCl — вода (70 : 41 : 39); Г — этанол — 1 М ацетат аммония, pH 7,5 (7 : 3).

Центрифугирование проводили на центрифугах К-23, К-24, VAC-601 (ГДР), «Spinco L-65» (США), электрофорез — на приборе «Bio-Red» (США), модель 220 (94804). Гели сканировали на «SCAN-400» (Soeye Loebl, Англия). Вещества на бумаге и в геле обнаруживали при помощи УФ-света бактерицидной лампы БУФ-15 или по радиоактивности. Для измерения радиоактивности растворов пробы по 0,02—0,5 мл вносили в

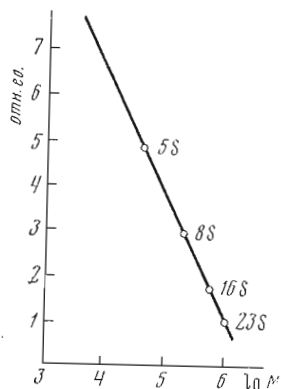


Рис. 3. Зависимость электрофоретической подвижности рРНК (в отн. ед.) от логарифма молекулярного веса. За единицу подвижности принята подвижность 23S РНК

10 мл диоксанового сцинтиллятора (800 мл диоксана, 2 г PPO, 0,2 г PPOP, 200 мл метанола, 80 г нафталина). Радиоактивность на бумаге просчитывали в 5 мл толуольного сцинтиллятора (1 л толуола, 0,2 г PPOP, 4 г PPO). ^{32}P -радиоактивность в геле считали по Черенкову в 1 мл воды. Во всех случаях использовали счетчик «Mark-II» (Nuclear Chicago, США).

Все буферные растворы, используемые для выделения рибосом и РНК, предварительно обрабатывали бентонитом [14].

Тройной комплекс рибосома — тРНК — $(\text{pU})_6\text{pUCHRCI}$ получали в условиях, описанных Ниренбергом и Ледером [15]: 2 нмоль рибосом, 27 нмоль тРНК и 26 нмоль $(\text{pU})_6\text{pUCHRCI}$ в 1 мл буфера «связывания» (0,1 М трис- HNO_3 (рН 7,3), 0,05 М NH_4NO_3 и 0,03 М $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$) инкубировали 20 мин при 25° С. Тройной комплекс отделяли от несвязавшегося олигонуклеотида гель-фильтрацией на колонке (1,4×35 см) с сефадексом G-50, уравновешенной буфером «связывания».

Алкилирование рибосом. Модификацию рибосом [^{14}C] $(\text{pU})_6\text{pUCHRCI}$ в составе тройного комплекса проводили 24 ч при 25° С. По окончании реакции рибосомы осаждали 0,7 объемами этанола, центрифугировали 15 мин при 5000 об/мин на центрифуге К-23. Осадок растворяли в буфере «диссоциации» (0,02 М трис- HCl (рН 7,2), 0,1 М NH_4Cl , 0,5 мМ MgCl_2), центрифугировали 17 ч при 5° С в линейном градиенте плотности сахарозы 10—30% в буфере «диссоциации» на центрифуге «Spinco L-65» при 25 000 об/мин (ротатор SW-27). После центрифугирования реакцию смесь фракционировали по 1 мл и измеряли оптическую плотность при 260 нм и радиоактивность каждой фракции. Затем фракции, соответствующие 30S и 50S субъединицам, объединяли, доводили концентрацию Mg^{2+} до 0,01 М, осаждали субъединицы 0,7 объемами этанола. Степень модификации субъединиц определяли по оптической плотности и радиоактивности и выражали в моль реагента на моль рибосом.

Подготовительное выделение 16S РНК, модифицированной с помощью $(\text{pU})_6\text{pUCHRCI}$. Осадок модифицированных 30S субъединиц растворяли в буфере, содержащем 0,01 М трис- HCl (рН 7,5), 0,01 М EDTA, 0,5% SDS, и, добавив 1 объем 80% свежеперегнанного фенола, насыщенного этим же буфером, встряхивали 15 мин. Для отделения водного слоя от фенольного смесь центрифугировали 15 мин на центрифуге К-23 при 4000 об/мин. Водный слой отделяли, а к оставшемуся фенольному слою добавляли равный объем воды и встряхивали 15 мин. Центрифугировали 15 мин на центрифуге К-23 при 4000 об/мин. Водный слой отбирали и объединяли с первым водным слоем. Измеряли радиоактивность и оптическую плотность (260 нм) в водном слое. Степень модификации определяли по радиоактивности и оптическому поглощению при 260 нм и выражали в моль реагента на 1 моль 16S РНК. Молярную экстинкцию 16S РНК при рН 7 принимали равной $11,8 \cdot 10^6$ [16]. Для гидролиза ацетальной связи 0,1 н. HCl доводили рН раствора до 4, инкубировали 1 ч при 40° С [17]. Осаждали алкил-16S-РНК 2,5 объемами этанола, предварительно добавив $1/10$ объема 20% ацетата натрия (рН 7,0). Осадок трижды промывали этанолом, затем растворяли в воде и определяли оптическую плотность и радиоактивность. Степень модификации алкил-16S-РНК после гидролиза ацетальной связи определяли по оптической плотности и радиоактивности и выражали в моль реагента на 1 моль РНК. Долю лабильной модификации определяли по отношению радиоактивности в супернатанте к общей радиоактивности.

Идентификация продукта лабильной модификации. I. Супернатант упаривали до 0,2 мл, наносили по 60 мкл раствора на бумагу FN-1 и хроматографировали в системах А—Г. Содержание продукта лабильной модификации определяли, измеряя радиоактивность хроматограмм. Участки хроматограмм, соответствующие веществу с R_f 0,86; 0,88 и 0,86 в системах А, Б и Г, после счета радиоактивности в толуольном сцинтилляторе,

промывали 3—4 раза эфиром, высушивали и радиоактивный материал элюировали 3 мл 0,1 н. HCl в течение 12—15 ч. Элюаты упаривали досуха, следы HCl удаляли упариванием с водой (2—3 раза) и остаток растворяли в 100 мкл 0,01 М трис-HCl, pH 7,3. УФ-спектр снимали на микроспектрофотометре МСФП-1 (НИОХ СО АН СССР).

II. Супернатант наносили на микроколонку с DEAE-целлюлозой в Cl⁻ форме. Вещество с колонки элюировали хлористым натрием (линейный градиент 0—0,06 М NaCl в 0,01 М трис-HCl, pH 7,5). Вещество идентифицировали по положению на профиле элюции.

Кислотный гидролиз алкил-16S-РНК. К раствору алкил-16S-РНК добавляли конц. HCl до 1 н. и выдерживали 1 ч при 100° С. Гидролизат упаривали досуха. Затем остаток растворяли в 50 мкл 0,1 н. HCl и наносили на бумагу. Хроматографию проводили в присутствии свидетеля 7-RGua. Содержание алкилированных оснований определяли, измеряя радиоактивность хроматограмм. Алкилированные основания идентифицировали сравнением их хроматографических свойств с хроматографическими свойствами известных образцов. Хроматограммы обрабатывали как описано выше.

Введение ³²P-метки на 3'-конец 16S РНК с помощью [³²P]pCp осуществляли по методике [18]. О количестве пришитой к 3'-концу 16S РНК метки судили по интенсивности пятен, полученных радиоавтографией, после хроматографии алкил-16S-РНК, меченой [³²P]pCp, на полиэтиленмин-целлюлозе (Merck, ФРГ) в 0,35 М натрий-фосфатном буфере, pH 3,5.

Электрофорез 16S РНК проводили в пластинах (11×12×0,15 см) в 2,2% полиакриламид +0,5% агарозном геле [19] в 0,01 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,0) при напряжении 130 В в течение 2—3 ч. Состав геля (60 мл): 300 мг агарозы, 35,4 мл 0,01 М натрий-фосфатного буфера, 1,32 г акриламида, 0,066 г N,N'-метиленабисакриламида, 0,01 мл N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, 0,24 мл 10% персульфата аммония. Для нанесения на гель к образцам алкил-[3'-³²P]-16S РНК (см. рис. 2), растворенным в 10 мкл 0,01 М натрий-фосфатного буфера, добавляли 50% глицерин до концентрации 10%. В качестве контроля использовали 16S РНК, выделенную из той же партии рибосом, на которой проводили модификацию (как и модифицированные рибосомы, рибосомы этой партии прошли все стадии обработки). Контрольную 16S РНК подвергали тем же процедурам, что и алкилированную 16S РНК. Электрофорез контрольной и алкилированной 16S РНК проводили одновременно. На каждую пластину (контрольную и экспериментальную) наносили соответствующий образец 16S РНК и 4 стандарта (всего 7 дорожек в каждой пластине). В качестве стандартов использовали 23S, 16S, 5S и 8S РНК (полученную и охарактеризованную по [20]), в качестве маркера — бромфеноловый синий.

После электрофореза пластины выдерживали 15 мин в 1 М уксусной кислоте для фиксации РНК. Окрашивание гелей проводили бромистым этидием (30 мкг/мл) в течение 30 мин в темноте на холоду. Гель промывали водой и в УФ-свете фиксировали полосы 8S, 23S, 5S и 16S РНК для построения калибровочного графика. Для определения количества радиоактивных фрагментов алкилированной 16S РНК гель разрезали по 2 мм и просчитывали радиоактивность по Черенкову. В отдельных случаях гели сканировали.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kurland C. G. Structure and function of the bacterial ribosome. — Ann. Rev. Biochem., 1977, v. 46, p. 173—200.
2. Brimacombe R., Stöffler G., Wittmann H. G. Ribosome structure. — Ann. Rev. Biochem., 1978, v. 47, p. 217—249.
3. Будкер В. Г., Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Кобец Н. Д., Маев С. П. Аффинная модификация рибосом *Escherichia coli* в районе мРНК-связывающего центра

- аналогом гептауридилата, несущим на 3'-конце химически активную группу.— Молекулярн. биология, 1978, т. 12, вып. 3, с. 539—545.
4. Будкер В. Г., Кобец Н. Д., Коллекционер И. Е., Карпова Г. Г., Гринева Н. И. Аффинная модификация рибосом *Escherichia coli* 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензилиденовыми производными олигоуридилатов разной длины.— Молекулярн. биология, 1980, т. 14, вып. 3, с. 507—516.
 5. Гринева Н. И., Карпова Г. Г. Химическая направленность и позиционная специфичность алкилирования рибосомальной РНК 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]олигонуклеотидами в комплементарном комплексе.— Биоорган. химия, 1975, т. 1, № 5, с. 588—597.
 6. Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. Алкилирующие производные компонент нуклеиновых кислот. VIII. Превращение ацеталей 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензальдегида, производных пиримидиновых нуклеотидов и олигонуклеотидов.— Изв. Сиб. отд. АН СССР, 1970, № 4, сер. хим. наук, вып. 2, с. 111—118.
 7. Веньямина А. Г., Гринева Н. И. Алкилирующие производные компонентов нуклеиновых кислот. X. Снятие и превращения 2-хлорэтиламинобензилиденовых производных 5'-нуклеотидов.— Изв. Сиб. отд. АН СССР, 1971, № 9, сер. хим. наук, вып. 4, с. 111—117.
 8. Веньямина А. Г., Гринева Н. И., Карпова Г. Г. Алкилирующие производные компонентов нуклеиновых кислот. XVIII. Реакция алкилирования 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиденовых производных нуклеотидов.— Изв. Сиб. отд. АН СССР, 1974, № 6, сер. хим. наук, вып. 2, с. 130—138.
 9. Singer B., Sun L., Fraenkel-Conrat H. Effects of alkylation of phosphodiester and bases on infectivity and stability of Tobacco mosaic virus RNA.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, № 6, p. 2232—2236.
 10. Kusmierek J., Singer B. Sites of alkylation of poly(U) by agents of varying carcinogenicity and stability of products.— Biochim. et biophys. acta, 1976, v. 442, № 3, p. 420—431.
 11. Herr W., Charman N. M., Noller H. F. Mechanism of ribosomal subunit association: discrimination of specific sites in 16S RNA essential for association activity.— J. Mol. Biol., 1979, v. 130, № 4, p. 433—449.
 12. Zimmermann R. A., Gates S. M., Schwartz I., Ofengand J. Covalent cross-linking of transfer ribonucleic acid to the ribosomal site. Site of reaction in 16S ribonucleic acid.— Biochemistry, 1979, v. 18, № 20, p. 4333—4339.
 13. Будкер В. Г., Гимаутдинова О. И., Карпова Г. Г., Кобец Н. Д., Теплова Н. М. Специфическая химическая модификация рибосом вблизи мРНК-связывающего центра.— Молекулярн. биология, 1976, т. 10, вып. 2, с. 340—346.
 14. Венкстери Т. В., Ли Л., Крутилина А. И., Аксельрод В. Д., Мурзабеков А. Д., Баев А. А. Первичная структура валиновой транспортной РНК *Saccharomyces cerevisiae*. II. Олигонуклеотиды гуанил-рибонуклеазного гидролизата.— Молекулярн. биология, 1968, т. 2, вып. 4, с. 597—611.
 15. Nirenberg M., Leder P. Ribonucleic acid (RNA) codewords and proteins synthesis. The effect of trinucleotides upon the binding of soluble RNA (sRNA) to ribosomes.— Science, 1964, v. 145, № 3639, p. 1399—1407.
 16. Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Пичко Н. П., Чимигова Т. А. Комплементарно адресованное алкилирование рибосомных РНК *Escherichia coli* в комплексах особой конформации.— Молекулярн. биология, 1979, т. 13, вып. 5, с. 1012—1020.
 17. Власов В. В., Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. Эффективность ацеталей 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензальдегида, производных олигонуклеотидов, при алкилировании тРНК.— Молекулярн. биология, 1970, т. 4, вып. 2, с. 201—204.
 18. Bruce A. G., Uhlenbeck O. O. Reaction at the termini of tRNA with T4 RNA ligase.— Nucleic Acids Res., 1978, v. 5, № 10, p. 3665—3677.
 19. McMaster G. K., Carmichael G. G. Analysis of single- and double stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 11, p. 4835—4838.
 20. Zimmerman R. A., Muto A., Fellner P., Ehresmann C., Branlant C. Location of ribosomal protein binding sites on 16S ribosomal RNA.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, № 5, p. 1282—1286.

Поступила в редакцию
16.III.1981
После доработки
4.V.1981

AFFINITY LABELING OF 16S RNA IN *E. COLI* RIBOSOMES BY HEPTAURIDYLATE
ANALOG BEARING A CHEMICALLY ACTIVE GROUP AT THE 3'-END

KARPOVA G. G., KOBETS N. D., SILINA S. A., GODOVICOV A. A.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Academy
of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

Alkylation of 16S RNA was studied in the *E. coli* ribosomes using a mRNA analog, heptauridylate 2',3'-O-4-(N-2-chloroethyl-N-methylamino)benzylidene derivative. The structure of the alkylation products was established. The predominant sites affected by modification in 16S RNA were shown to be the phosphodiester bonds and guanine N-7 atoms. Modification of the former produces phosphotriesters readily hydrolysable in mildly acidic solutions, thereby forming 4-(N-2-hydroxyethyl-N-methylamino)benzaldehyde. In neutral or weakly alkaline solutions, the phosphotriester hydrolysis is accompanied by the 16S RNA cleavage at the modified loci positioned 480 ± 40 and 110 ± 10 nucleotides from the 3'-end.