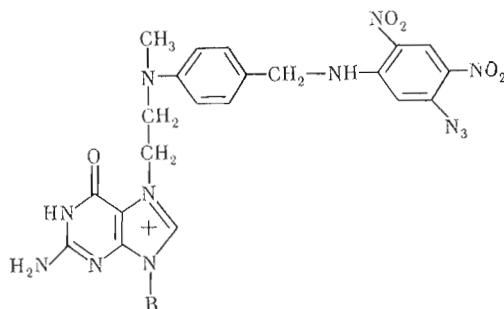




УДК 547.963.3.04

БЕЛКИ МАЛОЙ 30S СУБЧАСТИЦЫ РИБОСОМ *E. COLI*,  
ФОРМИРУЮЩИЕ тРНК-СВЯЗЫВАЮЩИЙ УЧАСТОК*Власов В. В., Грайфер Д. М., Карпова Г. Г.,  
Чижиков В. Е.**Институт органической химии Сибирского отделения  
Академии наук СССР, Новосибирск*

Ранее нами было показано, что аналоги тРНК<sup>Phe</sup>, содержащие до 3–4 арилазидных групп на остатках 7-алкилгуанозина в различных положениях молекулы, сохраняют способность к специфическому неферментативному связыванию в тройной комплекс с рибосомами *E. coli* и poly(U) и могут быть использованы в качестве реакционноспособных аналогов тРНК для исследования топографии тРНК-связывающих центров на рибосоме [1].

Строение модифицированных остатков гуанозина  
в тРНК

В настоящей работе мы идентифицировали рибосомные белки 30S субчастиц, модифицируемых реакционноспособным производным тРНК<sup>Phe</sup> в составе тройного комплекса, которые, по-видимому, формируют тРНК-связывающие участки 30S субчастицы.

В работе использовали тРНК<sup>Phe</sup> *E. coli* фирмы «Boehringer Mannheim GmbH», рибосомы *E. coli* MRE-600, poly(U) производства СКТБ БАВ (Новосибирск). 2,4-Динитро-5-фторфенилазид синтезировали в соответствии с методом [2], 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-[<sup>14</sup>C]-бензиламин с удельной радиоактивностью 25 Ки/моль получали согласно работе [3].

Модификацию тРНК<sup>Phe</sup> алкилирующим реагентом в условиях лабильности макроструктуры тРНК и введение арилазидных групп по остаткам 7-алкилгуанозина проводили по методике, описанной в работе [1]. Для

получения ковалентной связи между модифицированной тРНК<sup>Phe</sup> и рибосомами тройной комплекс облучали УФ-светом ( $\lambda > 350$ ) согласно методике [1]. По окончании реакции модифицированные 30S и 50S субчастицы выделяли центрифугированием тройного комплекса в линейном градиенте концентрации сахарозы (10–30%) в буфере следующего состава: 0,05 М трис-НСl (рН 7,5), 0,1 М NH<sub>4</sub>Cl, 0,1 мМ MgCl<sub>2</sub> (центрифуга «Spinco 5-65» фирмы «Beckman», США, ротор SW-27, 25 000 об/мин, 16 ч, 4° С).

Рибосомные белки выделяли из 30S субчастицы центрифугированием в линейном градиенте концентрации сахарозы (5–20%) в буфере, содержащем 0,025 М трис-НСl (рН 7,5), 0,1% додецилсульфат натрия, 2 мМ EDTA, 6 мМ меркаптоэтанол, как описано в работе [4]. тРНК<sup>Phe</sup>, ковалентно связанную с белками, гидролизовали РНКазамы А и Т<sub>1</sub>. Анализ модифицированных белков проводили двумерным электрофорезом в полиакриламидном геле по Говарду [5]. Пятна, соответствующие белкам, вырезали, белки с геля элюировали 0,5% додецилсульфатом натрия и определяли их радиоактивность в диоксановом сцинтиллаторе.

Оказалось, что при облучении тройного комплекса рибосома — модифицированная тРНК<sup>Phe</sup> — poly(U) до 35% модифицированной тРНК<sup>Phe</sup>, связанной в тройной комплекс, ковалентно присоединяется к рибосомам. Модификации подвергаются обе субчастицы рибосом. Степень модификации 30S субчастицы в 3 раза превышает степень модификации 50S субчастицы. В составе 30S субчастицы модифицируются белки S5, S9, S11, S12, S13, S19, S21 (300, 400, 420, 350, 370, 380 и 400 имп/мин над фоном 80 имп/мин соответственно). Очевидно, это белки, окружающие связанную с рибосомой тРНК<sup>Phe</sup>. Некоторые из них (S5, S9/S11) были локализованы в тРНК-связывающем центре ранее методом УФ-индуцированных сшивков тРНК с рибосомами [6]. Данные об участии белков S11 и S21 в формировании тРНК-связывающего центра были получены методом реконструкции 30S рибосомных субчастиц из 16S РНК и модифицированных белков в присутствии различных комбинаций немодифицированных белков [7].

Более широкий набор белков при модификации рибосом производным тРНК<sup>Phe</sup> объясняется, по-видимому, высокой реакционной способностью арилативных групп производного, способных реагировать практически с любыми аминокислотными радикалами. Следует отметить, что в этом использованном нами производном тРНК<sup>Phe</sup> реакционноспособные группы находятся на некотором удалении от оснований тРНК и могут реагировать с белками, сближенными с тРНК, но не образующими с тРНК плотных контактов. Модификации 16S РНК производным тРНК<sup>Phe</sup> в составе тройного комплекса не наблюдается.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Власов В. В., Лаврик О. И., Мамаев С. В., Ходырева С. Н., Чижиков В. Э., Швалье А. Ф. Модификация фенилаланил-тРНК синтетазы *Escherichia coli* производными тРНК<sup>Phe</sup>, несущими реакционноспособные группы на остатках гуанозина. — Молекулярная биология, 1980, т. 14, вып. 3, с. 531–538.
2. Wilson D. F., Miyata M. E., Erecinska M., Varderkooi J. M. An aryl azide suitable for photoaffinity labeling of amino groups in proteins. — Arch. Biochem. and Biophys., 1975, v. 171, № 1, p. 104–107.
3. Богачев В. С., Венъяминова А. Г., Гринцева Н. И., Ломакина Т. С. Алкилирующие производные компонентов нуклеиновых кислот. IX. Синтез и свойства уридиллил- и аденилил- (5'-N)-4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензиламинов — Изв. Сиб. отд. АН СССР, 1970, № 14, сер. хим. наук, вып. 6, с. 110–116.
4. Турчинский М. Ф., Бродде Н. Е., Кусова К. С., Абдурашидова Г. Г., Будовский Э. И. УФ-индуцированное образование РНК-белковых сшивков в 30S субчастицах рибосом *E. coli*. — Биоорганическая химия, 1977, т. 3, № 8, с. 1013–1019.
5. Howard G. A., Traut R. R. Separation and autoradiography of microgram quantities of ribosomal proteins. — FEBS Letters, 1973, v. 29, № 2, p. 177–180.
6. Абдурашидова Г. Г., Турчинский М. Ф., Салихов Т. А., Асланов Х. А., Будовский Э. И. Идентификация белков, взаимодействующих с тРНК в А- и Р-сайтах рибосом из *E. coli*. — Биоорганическая химия, 1978, т. 4, № 7, с. 982–983.

7. Fanning T. G., Cantrell M., Shin T. C., Graven G. R. Evidence that proteins S1, S11 and S21 directly participate in the binding of transfer RNA to the 30S ribosome.— *Nucleic Acids Res.*, 1978, v. 5, № 3, p. 933–950.

Поступила в редакцию  
4.XII.1980

### ***E. COLI* 30S RIBOSOMAL SUBUNIT PROTEINS FORMING THE tRNA BINDING SITE**

VLASOV V. V., GRAIFER D. M., KARPOVA G. G., CHIZIKOV V. E.

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

tRNA<sup>Phe</sup> derivatives, containing about 4 arylazidgroups in 7-alkylguanosine residues, were applied for labelling the ribosomal tRNA-binding site. Irradiation of the ternary complex ribosome: poly U:tRNA derivative resulted in a covalent attachment of up to 35% tRNA derivative to ribosome. Both ribosomal subunit were subject to modification, the extent of labelling being 3 times higher for the 30S as compared to 50S subunit. The proteins S5, S9, S11, S12, S13, S19, and S21 were modified in the 30S subunit.

---