



УДК 547.96.04

**НАПРАВЛЕННАЯ МОДИФИКАЦИЯ МАЛОЙ СУБЧАСТИЦЫ  
РИБОСОМ *S. oli* АРИЛАЗИДНЫМ ПРОИЗВОДНЫМ  
ГЕПТАДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДА, КОМПЛЕМЕНТАРНОГО  
3'-КОНЦЕВОМУ УЧАСТКУ 16S рРНК****Скрипкин Е. А., Крынецкий Е. Ю., Вейко В. П.,  
Копылов А. М., Богданов А. А., Шабарова З. А.**

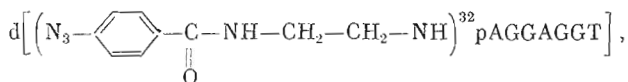
*Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория  
молекулярной биологии и биоорганической химии и химический факультет  
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Для изучения взаимного расположения рибосомных белков и рРНК в рибосомах предложен новый подход, основанный на способности производных синтетических олигодезоксирибонуклеотидов, имеющих фотоактивируемую группировку, связываться с экспонированными комплементарными участками рРНК в рибосоме и модифицировать ближайшие белки. Синтезировано арилазидное производное гептануклеотида, содержащее на 5'-конце фотоактивируемую группировку  $d[(N_3C_6H_4 \cdot CONHCH_2CH_2NH)^{32}pAGGAGGT]$ . Реагент комплементарен участку 1534–1540 16S рРНК, а его азидная модифицирующая группа находится на расстоянии около 10 Å от третьего нуклеотида с 3'-конца 16S рРНК. Основным продуктом специфической модификации 30S субчастицы рибосом является белок S5.

Для установления структуры рибосомы необходимы знания о взаимном расположении рРНК и белков. Традиционными подходами в этой области являются изучение взаимодействия белков с фрагментами рРНК, полученными нуклеазной деградацией [1, 2], и применение РНК-белковых сшивающих агентов (см., например, [3]). В обоих случаях определяются участки прямого контакта РНК и белка.

В компактных нативных субчастицах рибосом часть рРНК находится на поверхности и доступна для гидролиза нуклеазами [4, 5], модификации химическими реагентами [6] и связывания олигонуклеотидов [7]. Сведения о взаимном расположении этих экспонированных участков рРНК и рибосомных белков позволят существенно дополнить и уточнить данные, полученные традиционными методами.

В настоящей работе предложен новый подход с использованием фотоактивируемых реагентов — производных синтетических олигодезоксирибонуклеотидов [8]. С этой целью синтезировано соединение



которое способно, с одной стороны, к специфическим комплементарным взаимодействиям с экспонированным 3'-концевым участком 16S рРНК (1534–1540) в рибосоме (см. [9]), а с другой — к неспецифической модификации ближайших реакционных групп белков и РНК.

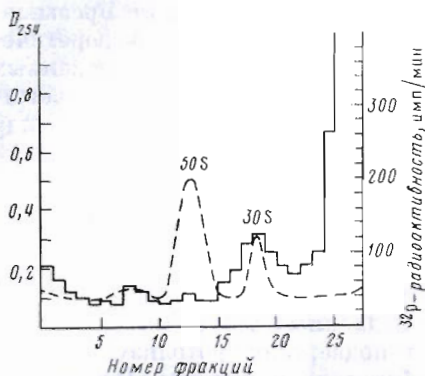


Рис. 1

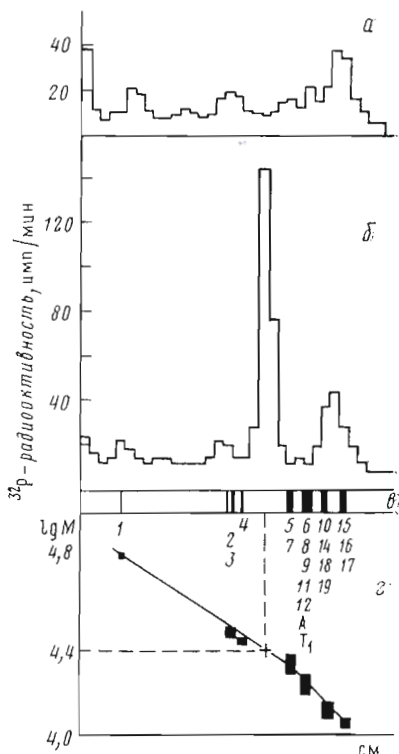


Рис. 2

Рис. 1. Разделение модифицированных 70S рибосом на субчастицы ультрацентрифугированием в градиенте концентрации сахарозы. Сплошной линией обозначена радиоактивность, пунктирной — поглощение при 254 нм

Рис. 2. Разделение белков модифицированной 30S субчастицы одномерным электрофорезом в присутствии додецилсульфата натрия. *a* — после темновой реакции, *б* — после фотореакции (для обеих реакций взято одинаковое количество реагента), *в* — стандартная диаграмма разделения белков 30S субчастицы, получаемая окрашиванием геля (*A* и *T<sub>1</sub>* — положение зон рибонуклеаз *A* и *T<sub>1</sub>* соответственно), *г* — диаграмма для определения молекулярного веса продукта модификации. Цифрами обозначено положение соответствующих 30S-белков. Молекулярные веса рибосомных белков взяты из работы [28]

Гептадезоксирибонуклеозидгексафосфат синтезировали твердофазным методом [10] и фосфорилировали с помощью  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  и  $\text{T}_4$ -полинуклеотидкиназы (КФ 2.7.1.78), что позволило одновременно получить радиоактивный меченый олигонуклеотид и ввести на его 5'-конец фосфатную группу, необходимую для синтеза фотоагента. Такой меченый синтетический олигонуклеотид хорошо связывался с рибосомами: кажущаяся константа ассоциации, определенная неравновесной гель-фильтрацией [11], была равна  $(3,6 \pm 1,2) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ . На основе радиоактивного олигонуклеотида и этилендиамина синтезирован 5'-фосфамид, а затем ацилированием *n*-азидобензойной кислотой и сам реагент [12, 13]. Весь синтез проводился без промежуточной очистки продуктов реакций и полученная смесь прямо использовалась для модификации рибосом, поскольку из всех компонентов смеси реакционной способностью обладает только конечный продукт — арилизидное производное олигонуклеотида. В то же время очистка микроколичеств высокомеченного соединения на промежуточных стадиях синтеза приводит к заметным потерям реагента. Содержание фотоактивируемого реагента в смеси достигало 30%.

Для повышения специфичности модификации 70S рибосомы обрабатывали недостатком реагента в соотношении 5 моль рибосом на 1 моль

неочищенного реагента, т. е. на 0,3 моль фотоактивируемого производного. После облучения УФ-светом с длиной волны более 300 нм избыток реагента удаляли гель-фильтрацией на сефадексе G-50.

Оказалось, что при модификации 70S рибосом в реакцию вступает исключительно 30S субчастица (рис. 1). Более того, степень модификации была одинаковой как для свободных 30S субчастиц, так и для 30S субчастиц в составе 70S рибосом. Эта величина составляла от 5 до 30 ммоль олигонуклеотида на 1 моль 30S субчастиц (в зависимости от исходного количества арилизидного производного в реакционной смеси), т. е. с субчастицами ковалентно связывалось до 10% введенного в реакцию фотосагента.

Весь дальнейший анализ продуктов модификации проведен для реакции олигонуклеотида с 30S субчастицами рибосом. Основным продуктом модификации оказался рибосомный белок, реакция с рНК не превышала 5–10% от модификации белка. На рис. 2б показано электрофоретическое разделение рибосомных белков, выделенных из модифицированных 30S субчастиц. Видно, что практически вся радиоактивность, соответствующая ковалентно связанному олигонуклеотиду, распределена между двумя зонами. Около 65% радиоактивности содержится в зоне, расположенной между зонами белка S4 и белков S5, S7, а остальная обнаружена в зоне группы низкомолекулярных белков. Аналогичная картина получена и для 30S субчастиц, выделенных из модифицированных 70S рибосом.

Известно, что после облучения ультрафиолетовым светом арилизидных реагентов долгоживущие продукты их фотоллиза способны к модификации в темноте [14, 15]. Для анализа таких медленных темновых реакций в отдельном эксперименте реагент сначала подвергали фотоллизу, а затем смешивали с раствором рибосом и инкубировали в темноте. На рис. 2а видно, что при темновой реакции модифицируется исключительно фракция низкомолекулярных белков. Это значит, что наличие радиоактивной метки в зоне между белками S4 и S5, S7 соответствует специфической реакции, происходящей только в момент облучения.

При электрофорезе в присутствии додецилсульфата натрия разделение белков происходит в основном по молекулярному весу, зарядовые эффекты играют не столь существенную роль. Принимая во внимание то, что ковалентное присоединение олигонуклеотида приводит к увеличению молекулярного веса модифицированного белка, можно примерно рассчитать изменение его электрофоретической подвижности. На рис. 2в представлена зависимость подвижности рибосомных белков при электрофорезе в 10% полиакриламидном геле от их молекулярного веса. Видно, что молекулярный вес модифицированного продукта составляет  $(23-25) \cdot 10^3$ . При молекулярном весе олигонуклеотида около  $2,5 \cdot 10^3$  положение зоны, обладающей максимальной радиоактивностью, соответствует модификации белков S5 или S7, но не белков S6-группы и других.

Еще одна попытка идентифицировать продукты реакции была сделана с помощью двумерного электрофореза белков в системе Метца — Богорада [16] (рис. 3). При этом в первом направлении (при pH 4,5) разделение рибосомных белков происходит по заряду, а во втором (в присутствии додецилсульфата натрия) — по молекулярному весу. Из сравнения картин, полученных путем окрашивания геля (рис. 3а), и его радиоавтографии (рис. 3б) видно, что ни одна из зон радиоактивности, соответствующая модифицированным белкам, не совпадает с зонами исходных, немодифицированных белков. Однако общая картина распределения зон в обоих случаях очень характерна и положение радиоактивных зон хорошо совпадает с зонами исходных белков, если предположить, что смещение модифицированных белков в первом направлении электрофореза определяется отрицательным зарядом олигонуклеотида. Аналогичное явление наблюдали Турчинский и др. [17]. В этом случае две основные зоны радиоактивности (B и C) можно отнести соответственно к белку S5 и одному

из группы белков S15, S16, S17, а две минорные зоны (A и D) — к белкам S3 и S10. Сдвиг во втором направлении согласуется с изменением молекулярного веса продуктов модификации. Сравнение величины сдвига модифицированного белка (зона B) относительно положения белков S5 и S7 с учетом сдвигов продуктов модификации белков S3 и S10 (зоны A, D) позволяет предположить, что основным продуктом специфической реакции является белок S5 (рис. 3, 4 — см. вклейку на с. 1057).

Дополнительное доказательство в пользу того, что белок S5 является продуктом специфической модификации, получено методом пептидных карт. Модифицированный белок после разделения в системе Метца — Богорада иодировали, гидролизовали трипсином и разделяли пептиды в двух направлениях в тонком слое целлюлозы (рис. 4). В качестве образцов сравнения использовали окрашенные зоны, соответствующие немодифицированным белкам S5 и S7, которые обрабатывали аналогичным способом. Пептидная карта исходного белка S5 (рис. 4а) — наиболее вероятного продукта модификации — состоит из трех основных пептидов с характерным «треугольным» расположением. Пептидная карта основного продукта специфической модификации (рис. 4б) в основном сходна с картой белка S5, хотя полностью и не совпадает с ней: небольшое смещение зон приводит к искажению «треугольника»; причина этого пока неясна. Фон радиоактивности по осям первого и второго направления наблюдается даже в контрольных образцах геля, исходно не содержащего пептидного материала. Приведенные пептидные карты служат еще одним доводом в пользу того, что продуктом реакции является белок S5, а не S7, который, как видно из рис. 4в, имеет характерное «диагональное» распределение иодированных пептидов.

Модификация белка S5, доказанная в настоящей работе, означает, что он локализован в 30S субчастице рибосом вблизи 3'-конца 16S рРНК. Такая локализация белка S5 противоречит современным моделям 30S субчастицы рибосом [18—20]. Однако, с другой стороны, такая локализация белка S5 хорошо соответствует известному факту о его участии в формировании мРНК-связывающего участка рибосомы [21, 22], поскольку сам 3'-конец 16S рРНК является местом связывания предынициаторного участка мРНК прокариот [9].

### Экспериментальная часть

70S рибосомы, 30S и 50S субчастицы выделяли из *E. coli* MRE 600, как описано ранее [23]. Препараты хранили в буфере 20 мМ триэтаноламин-HCl (рН 7,5), 20 мМ MgCl<sub>2</sub>, 200 мМ KCl при -40° С, а перед использованием активировали 20 мин при 37° С.

*Sинтез d[(N<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH)<sup>32</sup>pAGGAGGT]*. Гептадезоксерибонуклеозидгексафосфат d(AGGAGGT) синтезировали твердофазным методом [10]. После снятия с полимерного носителя препарат выделяли методами хроматографии на бумаге и ионообменной колоночной хроматографии при рН 3,5 и 7,0 в присутствии 7 М мочевины. Первичная структура олигонуклеотида была подтверждена методом «блуждающих пятен» (векторным анализом) [24]. Гептануклеотид фосфорилировали [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТР (150—1000 Ки/ммоль, Amersham) с помощью Т4-полинуклеотидкиназы (400 ед. акт./мл, ВНИИ прикладной энзимологии, Вильнюс) [25]. Смесь 6 нмоль d(AGGAGGT) (0,5 ОЕ<sub>260</sub>), 6 нмоль [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТР, 50 ед. акт. киназы, 3,5 мкмоль трис-HCl, 0,7 мкмоль MgCl<sub>2</sub>, 0,7 мкмоль меркаптоэтанола, 0,14 мкмоль спермидина в 100 мкл инкубировали 30 мин при 37° С, добавляли 100 нмоль холодного АТР, 50 ед. акт. киназы и инкубировали еще 30 мин при 37° С. Фосфорилированный олигонуклеотид выделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-75 (Pharmacia). Удельная радиоактивность олигонуклеотида была 20—60 мкКи/ОЕ<sub>260</sub>.



Синтез фотоактивируемого производного проводили, как описано ранее [12, 13], без промежуточной очистки продуктов реакций. Выход реагента и степень его чистоты определяли после гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда и разделения немодифицированного концевое мононуклеотида и его арилизидного производного микроколоночной хроматографией на DEAE-целлюлозе (рН 7,0). Содержание фотоактивируемого производного гептануклеотида в смеси было около 30%. Полученная смесь прямо использовалась для модификации рибосом.

*Модификация рибосом и их субчастиц.* 120 мкл раствора, содержащего 200 пмоль рибосом или субчастиц, разводили в 2 раза водой, насыщали аргоном и добавляли 40 пмоль неочищенного реагента. После инкубации в темноте (20 мин при 37°С и 40 мин при 4°С) реакционную смесь облучали 40 мин УФ-светом лампы ДРШ-250 через светофильтр (>300 нм) при 4°С в токе аргона при перемешивании. Условия облучения и фотоллиза выбраны в отдельных контрольных экспериментах. Реагент отделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-50. В случае 70S рибосом гель-фильтрацию проводили в буфере для диссоциации рибосом (10 мМ трис-НСl (рН 7,6), 0,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ KCl), в остальных случаях — в буфере для модификации.

*Анализ продуктов модификации рибосом.* Модифицированные рибосомы анализировали ультрацентрифугированием в градиенте концентрации сахарозы 10–30% в буфере для диссоциации (рис. 1). Ультрацентрифугирование проводили 16 ч при 4°С на центрифуге «Spinco L-2» (ротор SW-25) со скоростью 24 000 об/мин или на центрифуге K-32 (ротор C-30) в аналогичном режиме. Градиент фракционировали с помощью проточного спектрофотометра «Uvicord-II» (LKB). Радиоактивность фракций (0,8 мл) определяли на счетчике «Ultrabeta (LKB)» по Черенкову в течение 4–10 мин для каждой пробы.

*Анализ продуктов модификации 30S субчастиц.* Распределение радиоактивной метки между РНК и белком определяли после осаждения РНК добавлением равного объема раствора 6 М LiCl в 8 М мочеvine (16 ч, –20°С). После низкоскоростного центрифугирования измеряли радиоактивность осадка и супернатанта.

Одномерное разделение белков электрофорезом в 10% полиакриламидном геле в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия (0,1 М фосфатный буфер, рН 8,2) проводили по методу Лаэмли [26]. Модифицированные субчастицы после гель-фильтрации осаждали в течение 16 ч равным объемом холодного этанола при –20°С. После центрифугирования осадок высушивали и растворяли в 40 мкл буфера 10 мМ трис-НСl (рН 7,6) — 20 мМ EDTA — 6 М мочеvine, добавляли на 270 пмоль субчастиц 2 мкг рибонуклеазы А (Worthington), 1 мкг рибонуклеазы T<sub>1</sub> (Sigma) и инкубировали 1 ч при 40°С [21]. Белок осаждали равным объемом 10% раствора трихлоруксусной кислоты, промывали ацетоном и растворяли в буфере для электрофореза с 1% додецилсульфата натрия. Образцы прогревали 10 мин при 80°С и наносили на гель. Форез проводили при напряжении 10 В/см, используя бромфеноловый синий в качестве маркера. После электрофореза гель окрашивали амидовым черным, разрезали на зоны по 2–3 мм и определяли радиоактивность по Черенкову в течение 10 мин для каждой пробы (рис. 2).

Двумерное разделение белков проводили по Метцу — Богораду [16] в модификации Турчинского и др. [17]. Образцы белков готовили как описано выше. Гель окрашивали кумасси бриллиантовым голубым R-250 (Serva) и подвергали радиоавтографии на пленке РТ-1 (Шостка).

Радиоактивную зону геля, а также окрашенные зоны белков S5 и S7 вырезали, промывали растворами изопропанола и метанола, сушили. Гель заливали 30 мкл раствора 50 мМ бикарбоната аммония, рН 8,5, добавляли 2 мкл (около 100 мкКи) Na<sup>125</sup>I (Amersham), 20 мкл 1% раствора хлорамин Т (Merck) и инкубировали 80 мин при 20°С. Реакцию останавли-

вали добавлением 1 мкл меркаптоэтанола и 1 мл 50% метанола (15 мин, 20° С). После промывания раствором 50% метанола гель заливали 250 мкл 50 мМ бикарбоната аммония (рН 8,5) и 250 мкл раствора трипсина (100 мкг/мл, Worthington) и инкубировали 16 ч при 37° С. Гидролизат после удаления геля лиофилизировали, растворяли в воде и разделяли в тонком слое целлюлозы (Schleicher und Schüll) в двух направлениях: высоковольтный электрофорез (90 В/см) и хроматография [27].

Авторы выражают благодарность А. Л. Иштуиной за выделение рибосом и 30S субчастиц; Т. Ф. Быстровой за препараты белков S5 и S7; М. Г. Ивановской за реагенты и консультацию при синтезе арилизидного производного; Г. Г. Абдурашидовой и М. Ф. Турчинскому (ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР) за помощь в идентификации белков; Н. Л. Тетериной за помощь в векторном анализе олигонуклеотида.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Zimmermann R. A., Muto A., Mackie G. A. RNA-protein interaction in the ribosome. II. Binding of ribosomal proteins to isolated fragments of the 16S RNA.— J. Mol. Biol., 1974, v. 86, № 2, p. 433–450.
2. Brimacombe R., Stöffler G., Wittmann H. G. Ribosome structure.— Ann. Rev. Biochem., 1978, v. 47, p. 217–249.
3. Oste C., Brimacombe R. The use of sym-triazine trichloride in RNA-protein cross-linking studies with *Escherichia coli* ribosomal subunits.— Molec. Gen. Genet., 1979, v. 168, № 1, p. 81–86.
4. Santer M., Chung S.-C., Harman G., Estner M., Hendrick J. P., Hopper J., Brecht C., Pandhi P. Comparative surface structure of 16S ribosomal ribonucleic acid of 30S ribosomes of procaryotic cells.— J. Bacteriol., 1979, v. 140, № 1, p. 131–140.
5. Teterina N. L., Kopylov A. M., Bogdanov A. A. Segments of the 16S RNA located on the surface of the 30S subunit of *Escherichia coli* ribosomes.— FEBS Lett., 1980, v. 116, № 2, p. 265–268.
6. Woese C. R., Magrum L. J., Gupta R., Siegel R. B., Stahl D. A., Kop J., Crawford N., Brosius J., Gutell R., Hogan J. J., Noller H. F. Secondary structure model for bacterial 16S ribosomal RNA: phylogenetic, enzymatic and chemical evidence.— Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 10, p. 2275–2293.
7. Kopylov A. M., Chichkova N. V., Bogdanov A. A., Vasilenko S. K. Complementary binding of oligonucleotides with 16S RNA and ribosomal ribonucleoproteins.— Molec. Biol. Reports, 1975, v. 2, № 2, p. 95–100.
8. Крынецкий Е. Ю., Скрипкин Е. А., Вейко В. П., Копылов А. М., Богданов А. А., Шабарова З. А. Направленная модификация рибосом *E. coli* арилизидными производными октадезоксирибонуклеотидов.— деп. ВИНТИ, 26/XI-1979, № 3995-79.
9. Backendorf C., Overbeek G. P., van Boom J. H., van der Marel G., Veeneman G., van Duin J. Role of 16S RNA in ribosome messenger recognition.— Eur. J. Biochem., 1980, v. 110, № 2, p. 599–604.
10. Potapov V. K., Veico V. P., Koroleva O. N., Shabarova Z. A. Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides on a grafted polymer support.— Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, № 6, p. 2041–2056.
11. Skripkin E. A., Kopylov A. M., Bogdanov A. A., Vinogradov S. V., Berlin Yu. A. rRNA topography in ribosome. IV. The accessibility of the 5'-end region of 16S RNA.— Molec. Biol. Reports, 1979, v. 5, № 4, p. 221–224.
12. Крынецкий Е. Ю., Ивановская М. Г., Друца В. Л., Пурмаль А. А., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. Синтез фотоаффинных реагентов — производных октадезоксирибонуклеотида, комплементарного участку 3'-концевого фрагмента 16S рРНК рибосом *E. coli*.— Докл. АН СССР, 1979, т. 247, № 3, с. 752–754.
13. Ивановская М. Г., Соколова Н. И., Шабарова З. А. Синтез фотоактивируемых арилизидсодержащих производных пентадезоксирибонуклеотида.— Биоорганическая химия, 1979, т. 5, № 1, с. 35–40.
14. Cooperman B. S., Janes E. N., Brunswick D. J., Luddy M. A. Photoincorporation of puromycin into *Escherichia coli* ribosomes.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, № 8, p. 2974–2978.
15. Nielsen P. E., Leick V., Burchardt O. On photoaffinity labeling of *Escherichia coli* ribosomes using an azidochloramphenicol analogue.— FEBS Lett., 1978, v. 94, № 2, p. 287–290.
16. Metz L. Y., Bogorad L. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: an improved method for ribosomal proteins.— Anal. Biochem., 1974, v. 57, № 1, p. 200–210.
17. Турчинский М. Ф., Броуде Н. Е., Кусова К. С., Абдурашидова Г. Г., Будовский Э. И. УФ-индуцированное образование РНК-белковых сшивок в 30S субчастицах рибосом *E. coli*.— Биоорганическая химия, 1977, т. 3, № 8, с. 1013–1020.

18. Tischendorf G. W., Zeichhardt H., Stöffler G. Architecture of the *Escherichia coli* ribosome as determined by immune electron microscopy.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, № 12, p. 4820–4824.
19. Lake J. A., Kahan L. Ribosomal proteins S5, S11, S13 and S19 localized by electron microscopy of antibody-labeled subunits.—J. Mol. Biol., 1975, v. 99, № 4, p. 631–644.
20. Спирип А. С., Сердюк И. Н., Шпунгин И. Л., Васильев В. Д. Четвертичная структура рибосомной 30S субчастицы: модель и ее экспериментальная проверка.—Молекулярн. биология, 1979, т. 13, № 6, с. 1384–1396.
21. Towbin H., Elson D. A photoaffinity labelling study of the messenger RNA-binding region of *Escherichia coli* ribosomes.—Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, № 9, p. 3389–3407.
22. Бродде Н. Е., Кусова Р. С., Медведева Н. И., Будовский Э. И. Белки 30S субчастицы рибосом *E. coli*, участвующие во взаимодействии с матричной РНК.—Вьюорган. химия, 1980, т. 6, № 9, с. 1303–1306.
23. Тетерина Н. Л., Копылов А. М., Богданов А. А. Топография рРНК в рибосомах. Действие панкреатической РНКазы на малую субчастицу рибосом.—Биохимия, 1978, т. 43, № 2, с. 229–234.
24. Silberkland M., Gillum A. M., RajBandary U. L. The use of nuclease P<sub>1</sub> in sequence analysis of end group labeling RNA.—Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 12, p. 4091–4108.
25. Richardson C. Polynucleotide kinase from *E. coli* infected with bacteriophage T 4.—In: Proc. Nucl. Acids Res. N. Y.: Acad. Press, 1971, v. 2, p. 815–828.
26. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4.—Nature, 1970, v. 227, № 5259, p. 680–685.
27. Elder J. H., Pickett R. A. II, Hampton J., Lerner R. A. Radioiodination of proteins in single polyacrylamide gel slices. Tryptic peptide analysis of all the major members of complex multicomponent systems using microgram quantities of total protein.—J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 18, p. 6510–6515.
28. Dzionara M., Kaltschmidt E., Wittmann H. G. Ribosomal proteins. XIII. Molecular weights of isolated ribosomal proteins of *Escherichia coli*.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, v. 67, № 4, p. 1909–1913.

Поступила в редакцию  
12.XI.1980

#### SITE-SPECIFIC MODIFICATION OF *E. coli* SMALL RIBOSOMAL SUBUNIT WITH ARYLAZIDE DERIVATIVE OF HEPTADEXOXYRIBONUCLEOTIDE COMPLEMENTARY TO THE 3'-END REGION OF 16S RNA

SKRIPKIN E. A., KRYNETSKY E. Yu., VEIKO V. P., KOPYLOV A. M.,  
BOGDANOV A. A., SHABAROVA Z. A.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry  
and Chemical Department, M. V. Lomonosov State University, Moscow*

A new approach for studying RNA-protein mutual arrangement has been developed. It is based on the ability of a synthetic oligodeoxyribonucleotide bearing a photoactive group to bind complementarily to the exposed regions of rRNA in the ribosome and modify some closely located proteins. Such a derivative of heptanucleotide, carrying arylazide group at its 5'-end, has been synthesized: d[(N<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH)<sup>32</sup>·pAGGAGGT]. The derivative binds complementarily with 16S rRNA region 1534–1540 and has its azide group about 10 Å apart from the third 3'-end nucleotide of 16S rRNA. The main target for this site-specific modification of 30S ribosomal subunit is protein S5.