



УДК 577.217.342:577.217.534

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСЛИРУЮЩИХ РИБОСОМ  
С ПОМОЩЬЮ КОЛОНОК, СОДЕРЖАЩИХ ИММОБИЛИЗОВАННУЮ  
ПОЛИУРИДИЛОВУЮ КИСЛОТУ

Баранов В. И.

*Институт белка Академии наук СССР, г. Пушкино Московской обл.*

**Описан усовершенствованный метод** получения транслирующих рибосом с помощью колонок, содержащих иммобилизованную полиуридиловую кислоту. Особенность метода состоит в том, что, во-первых, в системе трансляции использованы соотношения компонентов, оптимальные для получения транслирующих рибосом с высоким выходом. Во-вторых, осуществляется очистка транслирующих рибосом от примесей нетранслирующих частиц путем пропускания через колонку буфера, содержащего 5 мМ  $MgCl_2$  и 250 мМ  $NH_4Cl$ . Чистота транслирующих рибосом составляет не менее 95%, выход активных рибосом — 5–20% исходного количества рибосом. Затраты на реагенты при этом снижены в 15–20 раз.

Высокая чистота препарата функционально активных рибосом — одно из основных требований, предъявляемых к рибосомам при изучении отдельных стадий элонгационного цикла, а также при изучении структуры функционирующей рибосомы. В то же время реальное содержание активных в трансляции рибосом в препаратах, полученных различными методами, как правило, не превышает 20–50% [1–6].

Решить проблему получения 100% активных препаратов транслирующих рибосом помог новый уникальный метод твердофазной системы трансляции [7], основанный на использовании в системе трансляции матрицы  $poly(U)$ , ковалентно связанной с твердым носителем (целлюлозой или сефарозой) за 3'-конец через расщепляемый S–S-мостик [8]. Этот подход позволил селективно выделять из смеси рибосом только те из них, которые способны синтезировать полипептид. Использование этого метода для получения транслирующих рибосом, находящихся на разных стадиях процесса элонгации, детально описано в работах [9, 10].

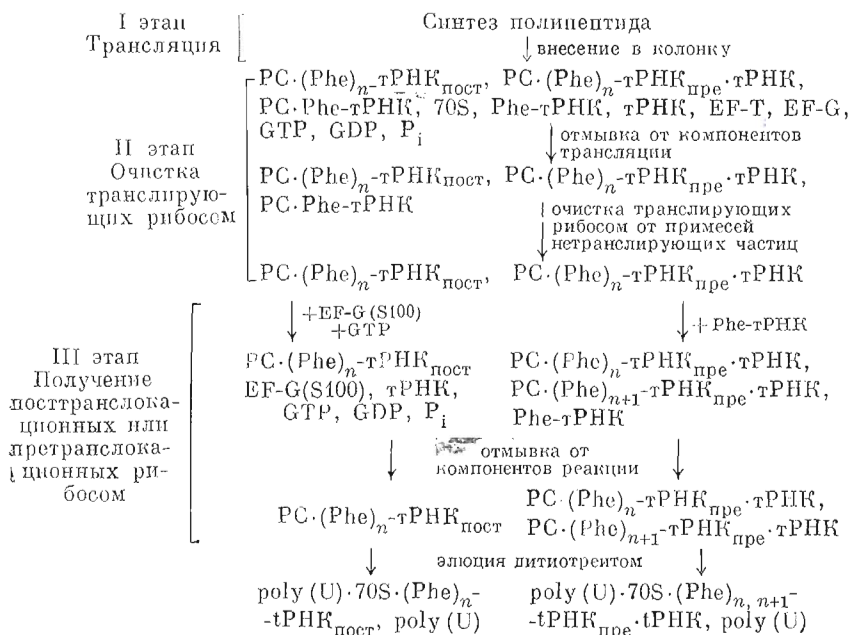
Процедура получения транслирующих рибосом состояла из трех основных этапов (см. схему). На первом этапе проводили синтез полипептида на матрице, ковалентно связанной с твердым носителем через расщепляемый дисульфидный мостик. Второй этап состоял в отмывке транслирующих рибосом от компонентов трансляции и примесей нетранслирующих рибосом при помощи экзогенной  $poly(U)$ . На третьем этапе получали транслирующие рибосомы, находящиеся либо в претранслокационном, либо в посттранслокационном состоянии и элюировали их с колонки буфером, содержащим дитиотреит. В результате получали транслирующие рибосомы не менее 80% чистоты, несущие  $poly(U)$  и  $poly(Phe)$ -тРНК и находящиеся на требуемой стадии процесса элонгации.

Основными существенными недостатками предложенного метода являлись его дороговизна и низкий выход транслирующих рибосом (1–2,5% от исходного количества рибосом).

В настоящей работе описана твердофазная система трансляции, в которой произведены модификации первого и второго этапов процедуры получения транслирующих рибосом. Модификации позволили поднять выход

---

Приятые сокращения: СМС-S-S- $poly(U)$  — полиуридиловая кислота, ковалентно связанная за 3'-конец с карбоксиметилцеллюлозой через дисульфидный мостик; тРНК — тотальная тРНК из *E. coli*; Phe-тРНК — тотальная тРНК из *E. coli*, аминокислотированная фенилаланином, aa-тРНК — аминокислот-тРНК, ТСА — трихлоруксусная кислота.



Принятые обозначения; PC — 70S рибосомы, связанные с твердофазной poly(U); (Phe)<sub>n</sub> — полифенилаланин, состоящий из n аминокислотных остатков; (Phe)<sub>n</sub>-tRNA<sub>пост</sub> — полифенилаланин-tRNA в P-участке рибосом; (Phe)<sub>n</sub>-tRNA<sub>пре</sub> — полифенилаланин-tRNA в A-участке рибосом.

транслирующих рибосом до 5—20% в расчете на исходное количество рибосом. Затраты на реагенты при этом были снижены в 15—20 раз. Чистота транслирующих рибосом составляла не менее 95%.

Модификация первого этапа получения транслирующих рибосом включала в себя подбор оптимальных условий трансляции (соотношений концентраций компонентов трансляции). Для этого был использован следующий принцип, применимый для многокомпонентной системы без ингибиторов: многокомпонентная система, состоящая из ферментов E<sub>i</sub> и субстратов A<sub>j</sub>, считается оптимизированной по компонентам трансляции, если ни одна из стадий процесса не является лимитирующей. При выполнении этого принципа концентрации всех ферментов [E<sub>i</sub>]<sub>0</sub> будут соответствовать точке перегиба кривой дозовой зависимости по каждому из ферментов E<sub>i</sub>.

Решение задачи сводится к следующему: при выбранных технически удобных концентрациях компонентов [E<sub>i</sub>] и [A<sub>j</sub>] снимают кинетику образования продукта. На возрастающем участке кинетической кривой снимают дозовую зависимость по любому из ферментов, скажем E<sub>1</sub>, и выбирают концентрацию [E<sub>1</sub>]<sub>0</sub> на возрастающем участке дозовой зависимости. При таком выборе стадия, обслуживаемая ферментом E<sub>1</sub>, является лимитирующей и, следовательно, все ферменты E<sub>i≠1</sub> и субстраты A<sub>j</sub> оказываются в избытке. Затем снимают дозовые зависимости по остальным ферментам E<sub>i≠1</sub> при концентрации фермента E<sub>1</sub>, равной [E<sub>1</sub>]<sub>0</sub>, и выбирают концентрации [E<sub>i≠1</sub>]<sub>0</sub> в точках перегиба дозовой зависимости. В результате такой процедуры концентрации всех ферментов [E<sub>i</sub>]<sub>0</sub> будут соответствовать точке перегиба кривой дозовой зависимости по каждому из ферментов, включая фермент E<sub>1</sub>. Концентрации (количества) субстратов A<sub>j</sub> определяют в соответствии с временем процесса или с требуемым количеством продукта.

При оптимизации бесклеточной системы трансляции согласно предложенному принципу полагали, что все компоненты системы трансляции, участвующие в нескольких циклах элонгации (рибосомы, факторы элон-

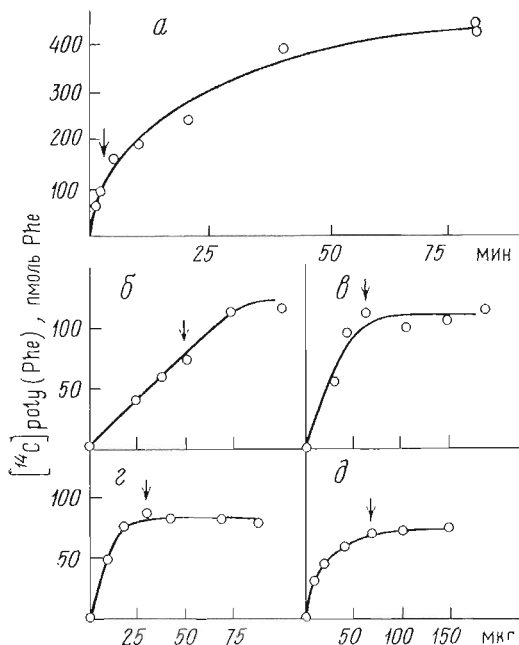


Рис. 1

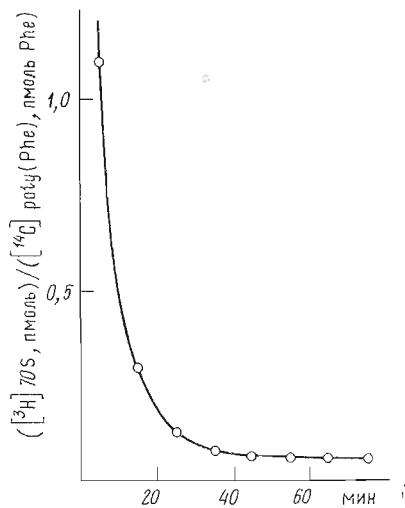


Рис. 2

Рис. 1. Подбор оптимальных соотношений компонентов в системе трансляции на свободной poly(U): кинетика синтеза (а); дозовые зависимости по 70S рибосомам (б); по ферментной фракции S100 (в); по тРНК (г); по poly(U) (д). Исходная инкубационная смесь состояла из 65 мкг 70S рибосом, 150 мкг ферментной фракции S100, 70 мкг тРНК, 150 мкг poly(U) в 100 мкл буфера 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, содержащего 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 3 мМ АТР, 0,4 мМ GTP, 5 мкМ [<sup>14</sup>C]Phe. Синтез вел при 25° С. Стрелками на рисунке обозначены время инкубации и количества компонентов в пробе (100 мкл), взятые в последующих экспериментах. По оси ординат отложены значения синтезированного [<sup>14</sup>C]poly(Phe) в пмоль, осаждаемого гидролизом горячей ТСА.

Рис. 2. Зависимость отношения [<sup>3</sup>H]70S/[<sup>14</sup>C]poly(Phe) в элюате от времени промывки колонки с транслирующими рибосомами буфером 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, содержащим 5 мМ MgCl<sub>2</sub> и 250 мМ NH<sub>4</sub>Cl при 37° С. Скорость промывки 40 мл/ч.

гации, синтетазы, тРНК, poly(U)), оптимизируются как ферменты. Субстратами при этом являлись АТР, GTP и фенилаланин.

Экспериментальные данные по оптимизации системы трансляции, состоящей из 70S рибосом, свободной poly(U), ферментной фракции S100, тотальной тРНК и субстратов АТР, GTP и [<sup>14</sup>C]Phe, представлены на рис. 1. В результате оптимизированная по компонентам система трансляции состояла из 50 мкг 70S рибосом, 65 мкг ферментной фракции S100, 30 мкг тотальной тРНК, 70 мкг свободной poly(U) в 100 мкл буфера 20 мМ трис-НСl (рН 7,5), содержащего 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ NH<sub>4</sub>Cl (стандартный буфер) и 3 мМ АТР, 0,4 мМ GTP и 5 мкМ [<sup>14</sup>C]Phe.

При переходе от оптимизированной системы трансляции на свободной poly(U) к твердофазной системе трансляции (СМС-S-S-poly(U)) получить насыщение системы по poly(U) даже при максимальных технически возможных количествах СМС-S-S-poly(U) в пробе не удалось. Это свидетельствовало о том, что кинетика синтеза [<sup>14</sup>C]poly(Phe) в такой системе отражает не столько скорость процесса элонгации, сколько скорость лимитирующего процесса — связывания 70S рибосом с СМС-S-S-poly(U). Для достижения насыщения по poly(U), ковалентно связанной с твердым носителем, замедляли скорость синтеза полипептида снижением концентрации ферментной фракции в 3—4 раза по сравнению с ее оптимальной концентрацией. В результате такой процедуры удалось получить насыщение по poly(U) при 60—80 мкг poly(U), ковалентно связанной с твердым носителем.

Остановка синтеза полипептида в бесклеточной системе трансляции без воздействия извне может происходить главным образом по двум причинам: либо матрица дочитывается до конца, либо один из субстратов оказывается исчерпанным. Обычно при получении транслирующих рибосом бывает крайне важно, чтобы рибосомы после снятия их с твердого носителя могли продолжать трансляцию. Следовательно, при синтезе полипептида в твердофазной системе трансляции необходимо остановить трансляцию до того, как матрица будет прочитана до конца. С этой целью в инкубационной смеси создавали заведомый недостаток субстрата [ $^{14}\text{C}$ ]Phe, снижая его количество в 100 мкл проба до 70–100 пмоль. В результате таких преобразований твердофазная система трансляции состояла из 50 мкг 70S рибосом, 20 мкг ферментной фракции S100, 30 мкг тотальной тРНК, 70 мкг poly(U), ковалентно связанной с твердым носителем, в 100 мкл стандартного буфера, содержащего 3 мМ АТФ, 0,4 мМ ГТФ, 1 мМ [ $^{14}\text{C}$ ]Phe.

На втором этапе получения транслирующих рибосом — очистке транслирующих рибосом от примесей нетранслирующих частиц — ранее использовалась стадия промывки колонки избытком экзогенной poly(U) [10]. Эта стадия — одна из самых дорогостоящих при получении транслирующих рибосом. Модификация второго этапа получения транслирующих рибосом состояла в подборе условий, способных заменить эту дорогостоящую стадию. Известно, что различные комплексы 70S рибосом с poly(U) и aa-тРНК обладают меньшей стабильностью к диссоциации при понижении ионов  $\text{Mg}^{2+}$ , чем транслирующие рибосомы, несущие полипептид [11, 12]. Используя [ $^3\text{H}$ ]70S рибосомы, радиоактивно меченные по рРНК, провели синтез [ $^{14}\text{C}$ ]poly(Phe) на СМС-S-S-poly(U) в твердофазной системе трансляции. Суспензию внесли в колонку и отмыли стандартным буфером от компонентов трансляции. Затем, варьируя температуру и концентрацию  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и  $\text{MgCl}_2$  в буфере, обнаружили, что при промывке колонки буфером 20 мМ трис- HCl (pH 7,5), содержащим 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 250 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , при 37° С с колонки эффективно элюируются [ $^3\text{H}$ ]70S рибосомы, не несущие полипептида. Элюция же транслирующих рибосом, несущих [ $^{14}\text{C}$ ]poly(Phe), происходит слабо. Анализируя соотношение [ $^3\text{H}$ ]70S/[ $^{14}\text{C}$ ]poly(Phe) в элюате, определили время промывки колонки этим буфером: при скорости элюции около 20–50 объемов колонки в 1 ч отношение [ $^3\text{H}$ ]70S/[ $^{14}\text{C}$ ]poly(Phe) становилось постоянным через 40–60 мин, что свидетельствовало о прекращении отмывки нетранслирующих рибосом от транслирующих (рис. 2).

В результате процедура получения транслирующих рибосом, находящихся в пре- или посттранслокационном состоянии, состояла, как и ранее (см. схему), из трех основных этапов с модификациями на первом и втором этапе. В таблице приведены сравнительные данные о количестве основных компонентов, необходимых для получения 1 мг транслирующих рибосом при использовании метода, описанного ранее [10], и модифицированного метода, предлагаемого в настоящей работе. Из таблицы следует, что проведенные модификации существенно удешевили твердофазную

Среднее количество основных компонентов, необходимых для получения 1 мг транслирующих рибосом

Компоненты	Количество, мг	
	метод твердофазной системы трансляции, описанный ранее [9–10]	модифицированный метод
70S рибосомы	80	10
Экзогенная poly(U)	180	0
Твердофазная poly(U)	18	14
Phe-тРНК, тРНК	200	6
Ферментная фракция S100	70	4

систему трансляции, снизив затраты на реагенты в 15–20 раз. В «Экспериментальной части» описана методика получения 1 мг транслирующих рибосом, находящихся в пре- или посттранслокационном состоянии.

В тех случаях, когда это было необходимо, элюированные с колонки транслирующие рибосомы, отделяли от низкомолекулярных компонентов (свободной poly(U), избытка дитиотрепта) хроматографией на биогеле

A-5M или центрифугированием в градиенте плотности глицерина. Благодаря этому раствор транслирующих рибосом, несущих poly(Phe)-тРНК и матрицу poly(U), не содержал никаких посторонних примесей. В таких препаратах можно было измерить концентрацию рибосом по УФ-поглощению и определить длину [<sup>14</sup>C]poly(Phe)

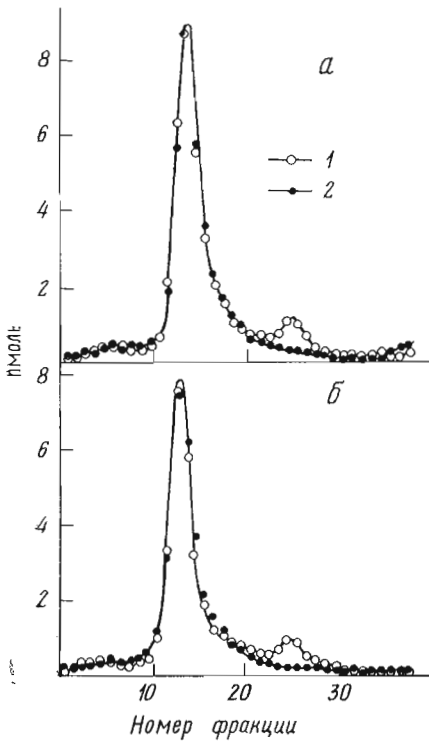


Рис. 3

Рис. 3. Седиментация транслирующих [<sup>3</sup>H]70S рибосом (1), несущих [<sup>14</sup>C]Phe-poly(Phe) (2), в градиенте концентрации сахарозы (5–25%) (ротор SW-41, 14 ч, 20 000 об/мин, 4° С). Седиментацию вели в буфере 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, с 100 мМ NH<sub>4</sub>Cl, содержащем 3 мМ MgCl<sub>2</sub> (а) и 30 мМ MgCl<sub>2</sub> (б). По оси ординат отложено количество [<sup>3</sup>H]70S рибосом и poly(Phe)-[<sup>14</sup>C]Phe (пмоль) в каждой фракции

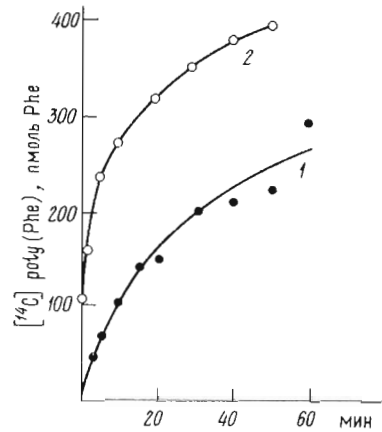


Рис. 4

Рис. 4. Кинетика синтеза [<sup>14</sup>C]poly(Phe) в твердофазной системе трансляции (1) и транслирующими рибосомами, полученными эволюцией с твердой фазы (2)

на единицу рибосом. Расчеты показали, что транслирующие рибосомы несут полипептид длиной 10–20 аминокислотных остатков. Вместе с тем знание радиоактивности полипептида, осаждаемого при гидролизе горячей ТСА, на единицу рибосом давало возможность определить количество активных в трансляции рибосом на каждом этапе. Опыт использования твердофазной системы трансляции для получения препаратов транслирующих рибосом показал, что количество активных в трансляции рибосом варьирует от препарата к препарату и составляет 15–60% исходного количества рибосом. Выход транслирующих рибосом при этом равнялся 5–20% исходного количества рибосом.

Для определения чистоты транслирующих рибосом от примесей не-транслирующих частиц на колонке были получены <sup>3</sup>H-меченые транслирующие рибосомы, несущие немеченый poly(Phe) и находящиеся в посттранслокационном состоянии (этапы I–III, схема). После промывки колонки от ферментной фракции посттранслокационные рибосомы переводили в претранслокационное состояние путем пропускания через колонку [<sup>14</sup>C]Phe-тРНК. В результате транслирующие рибосомы содержали в А-участке poly(Phe)-[<sup>14</sup>C]Phe-тРНК. После промывки колонки от сво-

бодной [ $^{14}\text{C}$ ]Phe-тРНК рибосомы элюировали буфером, содержащим дитиотреит.

Анализ элюата показал, что на 16,1 пмоль [ $^3\text{H}$ ]70S рибосом приходится 15,6 пмоль poly(Phe)-[ $^{14}\text{C}$ ]Phe, осаждаемого при гидролизе горячей ТСА. Поскольку процесс неэнзиматической транслокации при получении претранслокационных рибосом полностью заблокирован низкой температурой (4°С) и высокой концентрацией  $\text{Mg}^{2+}$  (20 мМ), полученные данные свидетельствуют о том, что не менее 95% рибосом несут poly(Phe), способны связывать следующую [ $^{14}\text{C}$ ]Phe-тРНК и образовывать пептидную связь. Таким образом, не менее 95% частиц, элюированных с колонки, являются функционально активными транслирующими рибосомами. На рис. 3 представлены данные по седиментации этих рибосом в градиенте концентрации сахарозы в буфере, содержащем 3 и 30 мМ  $\text{Mg}^{2+}$ .

В отдельном эксперименте было показано, что транслирующие рибосомы, элюированные с колонки дитиотреитом, способны продолжать трансляцию при добавлении к ним компонентов трансляции (фракцию S100, тРНК, Phe, АТР, ГТР). Для этого снимали кинетику синтеза [ $^{14}\text{C}$ ]poly(Phe) в твердофазной системе трансляции, содержащей 4 мкМ [ $^{14}\text{C}$ ]Phe. Синтез вели при 25°С. После 10 мин синтеза часть суспензии вносили в колонку и проводили очистку транслирующих рибосом согласно описанной процедуре (этапы I и II). После элюции буфером, содержащим 20 мМ дитиотреит, к транслирующим рибосомам добавляли компоненты трансляции (фракция S100, тРНК, [ $^{14}\text{C}$ ]Phe, АТР, ГТР) в тех же концентрациях, что были использованы в твердофазной системе трансляции и продолжали синтез при 25°С (рис. 4). Согласно рис. 4, транслирующие рибосомы, элюированные с колонки, способны эффективно продолжать трансляцию матрицы.

Таким образом, проведенный анализ показывает, что описанный в работе метод получения транслирующих рибосом с помощью колонок, содержащих иммобилизованную полиуридилловую кислоту, позволяет получать препараты функционально активных рибосом в пре- или посттранслокационном состоянии. Чистота транслирующих рибосом от примесей нетранслирующих частиц составляет не менее 95%. Выход активных рибосом при использовании описанного метода составляет 5–20% исходного количества рибосом. Основная часть транслирующих рибосом находится в виде моносом (см. рис. 3).

### Экспериментальная часть

В работе использованы [ $^{14}\text{C}$ ]Phe с уд. акт. 0,504 Ки/моль, (Amersham, Англия), Phe (Calbiochem, США) АТР (Merck, ФРГ), ГТР (Fluka, Швейцария), тРНК (Boehringer Mannheim, ФРГ), дитиотреит (Calbiochem, США).

Ферментную фракцию S100, Phe-тРНК и четырехкратно промытые рибосомы *E. coli*, штамм MRE-600, получали согласно процедуре, описанной ранее [13]. 70S рибосомы, меченные  $^3\text{H}$  по рРНК, с уд. акт. 10 Ки/ммоль получали из массы *E. coli*, выращенной на [ $^3\text{H}$ ]урациле. Рибосомы хранили в стандартном буфере, содержащем 10% глицерина, при -70°С. Ферментную фракцию S100 хранили при -70°С в буфере 20 мМ трис-НСl (рН 7,5), содержащем 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 250 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и 1 мМ дитиотреит. Непосредственно перед экспериментом ферментную фракцию переводили в стандартный буфер хроматографией на сефадексе G-50.

Poly(U), ковалентно связанную за 3'-конец с целлюлозой через S-S-мостик (СМС-S-S-Poly(U)), получали согласно методике, описанной ранее [10]. Емкость смолы составляла 21 мг poly(U) на 1 г целлюлозы.

Осаждение синтезированного poly(Phe) проводили путем гидролиза образца в растворе 5% ТСА при 90°С в течение 15 мин. Радиоактивность определяли на нитроцеллюлозных фильтрах. Счет суммарной радиоактивности в препаратах проводили в гомогенной системе тритон — толуол [14].

Ниже описана методика получения 1 мг транслирующих рибосом, находящихся в пре- или посттранслокационном состоянии.

*Этап I. Трансляция.* Стандартная реакционная смесь состояла из 11 мг 70S рибосом, 4 мг ферментной фракции S100, 6 мг тотальной тРНК, 0,7 г целлюлозы с 14 мг ковалентно связанной poly(U) в 19 мл стандартного буфера 20 mM трис-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub> и 100 mM NH<sub>4</sub>Cl, содержащего 60 мкмоль АТР и 8 мкмоль GTP. Смесь инкубировали 10 мин при перемешивании при 25° С. Затем запускали синтез добавлением к смеси 20 нмоль [<sup>14</sup>C]Phe в 1 мл стандартного буфера. Реакцию проводили при 25° С с постоянным перемешиванием в течение 15–20 мин до полного включения внесенного фенилаланина в полипептид.

*Этап II. Очистка транслирующих рибосом.* По окончании синтеза суспензию вносили в колонку, уплотняли. Объем смолы составлял 3–4 мл. Промывали колонку 60 мл стандартного буфера при 4° С, а затем 200 мл буфера 20 mM трис-HCl, pH 7,5, с 5 mM MgCl<sub>2</sub> и 250 mM NH<sub>4</sub>Cl в течение 1 ч при 37° С.

*Этап III. Получение пре- или посттранслокационных рибосом.* Пре-транслокационные рибосомы. После этапа II колонку промывали при 4° С 30 мл буфера 20 mM трис-HCl, pH 7,5, с 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NH<sub>4</sub>Cl. Затем через колонку пропускали в течение 20 мин при 4° С со скоростью 20 мл/ч по замкнутому циклу 2 мг тотальной тРНК, ацилированной фенилаланином (2 нмоль Phe), в 2 мл того же буфера. На этой стадии происходило неэнзиматическое связывание Phe-тРНК с транслирующими рибосомами на колонке. Низкая температура (4° С) и высокая концентрация MgCl<sub>2</sub> (20 mM) полностью блокировали при этом спонтанную (неэнзиматическую) транслокацию. Затем колонку отмывали от свободной тРНК 100 мл того же буфера при 4° С.

*Получение посттранслокационных рибосом.* После этапа II колонку промывали 30 мл стандартного буфера при 4° С. Затем через колонку пропускали в течение 10 мин при 25° С со скоростью 20 мл/ч по замкнутому циклу 1 мг ферментной фракции S100 в 2 мл стандартного буфера, содержащего 0,4 mM GTP. На этой стадии происходила транслокация транслирующих рибосом на колонке. Затем колонку отмывали 100 мл стандартного буфера при 4° С от продуктов реакции.

Элюцию пре- или посттранслокационных рибосом проводили буфером 20 mM трис-HCl, pH 7,5, с 20 mM MgCl<sub>2</sub> и 100 mM NH<sub>4</sub>Cl, содержащим 20 mM дитиотреит. Анализ транслирующих рибосом, полученных согласно описанной процедуре, методом пуромидиновой реакции [15] показал, что не менее 80% частиц находится в пре- или посттранслокационном состоянии.

Автор выражает глубокую благодарность акад. А. С. Спиричу, Н. В. Белицкой и Л. А. Рябовой за ценные советы и большую помощь в выполнении работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Expert-Beziqon A., Gueren M.-F., Hayes D. H., Legault L., Thibault J. *Biochimie*, 1974, v. 56, № 1, p. 77–89.
2. Le Goffic F., Vasec B., Marson N. *FEBS Lett.*, 1974, v. 41, № 1, p. 69–72.
3. Семенов Ю. И., Мухомов В. И., Куралова С. В. *Молекулярная биология*, 1976, т. 10, № 4, с. 754–763.
4. Svetlikova S. B., Kozlov A. V. *Acta biol. med. Germ.*, 1978, B. 37, № 9, S. 1343–1352.
5. Jelenc P. C. *Anal. Biochem.*, 1980, v. 105, № 2, p. 369–374.
6. Chinali G., Parmeggiani A. J. *Biol. Chem.*, 1980, v. 255, № 15, p. 7455–7459.
7. Belitsina N. V., Edizurov S. M., Glukhova E. A., Spirin A. S., Butorin A. S., Vasilenko S. K. *FEBS Lett.*, 1975, v. 57, № 3, p. 262–266.
8. Буровин А. С., Василенко С. К. *Изв. СО АН СССР. Сер. хим.*, 1976, т. 4, № 2, с. 143–147.
9. Belitsina N. V., Spirin A. S. *Methods Enzymol.*, 1979, v. 60, p. 745–760.
10. Baranov V. I., Belitsina N. V., Spirin A. S. *Methods Enzymol.*, 1979, v. 59, p. 382–397.
11. Schlessinger D., Mangiarotti G., Apirion D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1967, v. 58, № 4, p. 1752–1759.

12. Belitsina N. V., Spirin A. S. J. Mol. Biol., 1970, v. 52, № 1, p. 45-55.
13. Гаврилова Л. П., Смолянинов В. В. Молекулярн. биология, 1971, т. 5, № 6, с. 883-891.
14. Patterson M. S., Greene R. C. Anal. Chem., 1965, v. 37, № 7, p. 854-857.
15. Leder P., Bursztyn H. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1966, v. 25, № 2, p. 233-238.

Поступила в редакцию  
19.IV.1983

## PREPARATION OF TRANSLATING RIBOSOMES USING COLUMNS WITH IMMOBILIZED POLYURIDYLIC ACID

BARANOV V. I.

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

An improved method for preparation of translating ribosomes using columns with immobilized polyuridylic acid is described. A peculiarity of the method is that, first, optimal ratios of the components are used in the translation system for obtaining high yields of translating ribosomes. Second, purification of translating ribosomes from admixtures of non-translating particles is achieved by passing the buffer containing 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 250 mM NH<sub>4</sub>Cl through the column. The purity of the translating ribosomes is no less than 95%, the yield of active ribosomes is 5-20% of the initial amount of the ribosomes. Reagent expenditure is cut 15 to 20 times.