

С. А. БОГАТЫРЕВА, Э. Н. ТРИФОНОВ,
член-корреспондент АН СССР А. С. СПИРИН

ЗАВИСИМОСТЬ БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЫ СИНТЕЗА ПОЛИФЕНИЛАЛАНИНА ОТ СООТНОШЕНИЙ ДВУВАЛЕНТНЫХ И ОДНОВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ

Необходимым компонентом бесклеточной белоксинтезирующей системы являются неорганические катионы: двувалентные — в первую очередь Mg^{2+} , и одновалентные — NH_4^+ или K^+ (1). До сих пор, однако, оптимальные концентрации этих катионов для использования в бесклеточных системах подбирались путем варьирования концентрации одного катиона на фоне неизменной концентрации другого. Между тем, таким путем не может быть найден абсолютный оптимум по обоим катионам, так как сама концентрация второго катиона влияет на положение оптимума для первого. В настоящей работе была поставлена задача определить зависимость активности бесклеточной системы от соотношения катионов Mg^{2+} и NH_4^+ в среде и найти оптимум системы по двум указанным факторам. В качестве объекта исследования была взята бесклеточная система синтеза полифенилаланина на рибосомах *Escherichia coli* в присутствии полиуридилевой кислоты (поли-У) как матрицы.

Для бесклеточной системы использовали препараты « NH_4^+ -высоленных» рибосом *E. coli*, получение которых описано ранее (2). Ферментную фракцию, свободную от рибосом и нуклеиновых кислот, получали из экстракта *E. coli* путем его длительного центрифугирования при 100 000 *g* с последующим фракционированием на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (3). Препарат тотальной сРНК выделяли путем фенольной депротенинизации безрибосомного 100 000 *g* центрифугата из *E. coli* с последующей очисткой на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (4). Ферментативное аминокислотирование тотальной сРНК проводили C^{14} -L-фенилаланином с удельной активностью 125 $\mu C/\mu\text{моль}$, с последующей фенольной депротенинизацией смеси и очисткой на колонке с сефадексом Г-25 (5); лиофилизированный препарат такой C^{14} -фенилаланил-сРНК имел удельную активность 140 000 имп/мин на 1 мг тотальной сРНК (при эффективности счетчика 40%). АТФ (Na^+ -соль), ГТФ (Na^+ -соль), фосфоэнолпируват и поли-У (K^+ -соль) — фирмы «Реанал» (Венгрия); препарат пируваткиназы — фирмы «Бёрингер» (ФРГ).

Бесклеточную систему, в объеме 0,36 мл, составляли из следующих компонентов: рибосомы *E. coli* — 10 μg ; ферментная фракция *E. coli* 70—100 μg (в расчете на сухой белок); C^{14} -фенилаланил-сРНК 75 μg (в расчете на тотальную сРНК); поли-У 15 μg ; ГТФ 0,06 $\mu\text{моля}$; фосфоэнолпируват 1,25 $\mu\text{моля}$; пируваткиназа (диализованная от NH_4^+) 12 μg . Концентрация трис-буфера в системе была 0,025 *M*; меркаптоэтанол присутствовал в концентрации 0,0025 *M*; конечное значение рН 7,3 (при 37°); концентрации $MgCl_2$ и NH_4Cl варьировали в разных пробах. Инкубацию проб проводили 15 мин. при 37°. После инкубации пробы гидролизovali 5% трихлоруксусной кислотой при 90° в течение 15 мин., после чего охлаждали, осадки наносили на нитроцеллюлозные фильтры № 4 (экспериментальная фабрика ультрафильтров, г. Мытищи, Московская обл.), фильтры промывали 5% трихлоруксусной кислотой, высушивали при 70—90° и считали их радиоактивность на газопроточном метановом счетчике (эффективность счета около 40%).

Важно отметить, что количество рибосом в пробах было мало по сравнению с количеством всех других компонентов системы. Очевидно, что лишь в таких условиях избытка всех прочих компонентов можно выявить изменения активности самих рибосом в зависимости от ионных условий. Кривая зависимости включения C^{14} -фенилаланина в полипептид от концентрации рибосом при вышеуказанных количествах всех других компонентов и стандартной концентрации $MgCl_2$ и NH_4Cl (см. ниже), дана на рис. 1. Видно, что концентрация рибосом в пробах (10 μg на 0,36 мл) соответствует начальному линейному участку кривой, и есть еще многократный запас до выхода на плато.

Во всех сериях опытов с варьирующими концентрациями Mg^{2+} и NH_4^+ ставили так называемые стандартные пробы, где концентрация $MgCl_2$ была 0,015 M и NH_4Cl 0,07 M («стандартные условия»). Абсолютная величина включения C^{14} -фенилаланина в этих стандартных пробах несколько варьировала от серии к серии — в зависимости от препарата рибосом или ферментной фракции; вариации были в основном от 700 до 1100 имп/мин на 10 μg рибосом. Активность стандартной пробы в каждой серии опытов принималась за 100%.

Активность всех остальных проб выражали в процентах от величины включения C^{14} -фенилаланина в стандартной пробе.

В табл. 1 приведены выраженные таким путем результаты опытов с варьирующими концентрациями Mg^{2+} и NH_4^+ . Каждая цифра есть среднее из 2 или 3 параллельных проб. Цифры, помещенные в одной клетке

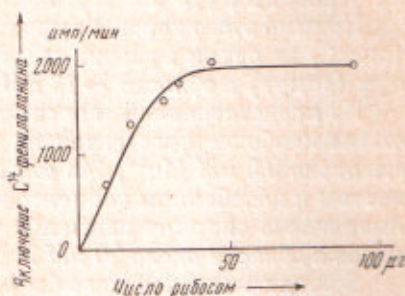


Рис. 1. Зависимость включения C^{14} -фенилаланина в бесклеточной системе от количества рибосом, при стандартных количествах других компонентов (см. текст); 0,015 M $MgCl_2$, 0,07 M NH_4Cl ; 37°; 15 мин

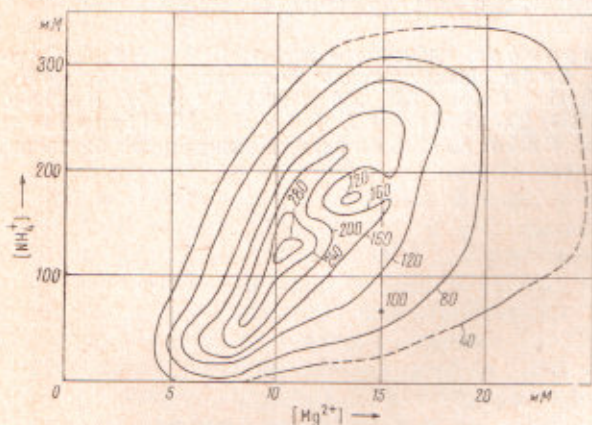


Рис. 2. Зависимость активности (включения C^{14} -фенилаланина) поли-У-управляемой бесклеточной системы от концентраций Mg^{2+} и NH_4^+ . Линии соответствуют уровням одинаковой активности; цифры на линиях означают активность системы, выраженную в процентах по отношению к активности стандартной системы (15 mM Mg^{2+} , 70 mM NH_4^+)

таблицы, — результаты независимых серий опытов.

Приведенные данные позволяют определить положение максимума включения C^{14} -фенилаланина (оптимума системы) и общий вид зависимости включения (Q) от концентраций Mg^{2+} (C_1) и NH_4^+ (C_2). Эта зависимость представляет собой некоторую поверхность в координатах (C_1 , C_2 , Q). На рис. 2 изображены линии уровней этой поверхности, отвечающие одинаковым величинам включения. Для построения этих «линий изоактивности» использовали экспериментально определенные зависимости $Q(C_1)$ при фиксированных значениях C_2 (70; 100; 120; 150; 175; 200 и 250 mM NH_4Cl) и $Q(C_2)$ при фиксированных значениях C_1 (10; 11; 12; 15 и 20 mM $MgCl_2$). При построении этих зависимостей и затем линий уровней учитывали имеющийся разброс экспериментальных данных (см. табл. 1), так чтобы получаемая поверхность $Q(C_1, C_2)$ (рис. 2) откло-

нялась от экспериментально определенных значений включения Q не более чем на величину среднеквадратичной погрешности этих значений (16% и меньше для повторных независимых серий опытов).

В результате проделанной работы были выявлены оптимальные ионные условия для синтеза полифенилаланина в бесклеточной системе *E. coli*: 10—11 мМ $MgCl_2$ при 120—130 мМ NH_4Cl (рис. 2). При этих условиях активность бесклеточной системы повышена по сравнению со стандартными условиями (15 мМ $MgCl_2$, 70 мМ NH_4Cl) приблизительно в 3 раза.

Помимо этого хорошо выраженного максимума, полученная поверхность (рис. 2) на одном из своих склонов обнаруживает также достоверный минимум («яму») в области ~ 13 мМ Mg^{2+} , 180 мМ NH_4^+ .

Из представленной зависимости видно, что активность бесклеточной системы наиболее чувствительна к колебаниям концентрации $MgCl_2$ в области около 9,5 мМ Mg^{2+} , 140 мМ NH_4^+ . Область с максимальной чувствительностью к колебаниям концентрации NH_4Cl — около 9 мМ Mg^{2+} , 40 мМ NH_4^+ . Активность системы наименее чувствительна к колебаниям концентраций ионов в области около 20 мМ Mg^{2+} , 200 мМ NH_4^+ .

В заключение хотелось бы отметить, что в условиях, при которых здесь наблюдается максимальная активность бесклеточной системы (~ 10 мМ Mg^{2+} , ~ 120 мМ NH_4^+ , 37°, рН 7,3), ассоциация между рибосомными субчастицами довольно лабильна, так что по крайней мере нетранслирующие 70S-рибосомы находятся как раз в состоянии полудиссоциации⁽⁶⁾.

Авторы приносят большую благодарность Н. А. Барулиной и Г. А. Кузнецовой за предоставление препаратов рибосом, суммарной сРНК и ферментной фракции *E. coli*, а также В. И. Гельфанду и В. А. Розенблату за обсуждение результатов работы.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
10 VII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. С. Спири, Л. П. Гаврилова, Рибосома, «Наука», 1968. ² А. С. Спири, М. Ю. Софронова, Б. Сабо, Молекулярная биология, 4, № 4 (1970).
³ P. Traub, W. Zillig, Zs. physiol. Chem., 343, 246 (1966). ⁴ R. W. Holley, J. Argar et al., J. Biol. Chem., 236, 200 (1961). ⁵ J. G. Levin, M. Nirenberg, J. Mol. Biol., 34, 467 (1968). ⁶ Б. Сабо, А. С. Спири, Молекулярная биология, 4, № 4 (1970).