

С. А. БОГАТЫРЕВА, академик А. С. СПИРИН

**ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ОДНО- И ДВУХВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ  
НА СПЕЦИФИЧЕСКОЕ СВЯЗЫВАНИЕ АМИНОАЦИЛ-тРНК  
С РИБОСОМНОЙ 30 S СУБЧАСТИЦЕЙ**

Рибосомы *in vitro* способны ассоциировать с некоторыми полинуклеотидами и аминоксил-тРНК, образуя комплексы рибосома — матрица — аминоксил-тРНК. При этом происходит строго специфический выбор аминоксил-тРНК в соответствии с кодонами матричного полинуклеотида — так называемое «специфическое связывание» аминоксил-тРНК. Известно, что основную ответственность за специфическое связывание аминоксил-тРНК на рибосоме в присутствии матрицы несет 30 S субчастица (1). Это специ-

Таблица 1

Влияние одновалентных катионов (концентрация вводимых солей составляла 0,1 M) на специфическое связывание, пмп/мпн, С<sup>14</sup>-фенилаланил-тРНК с 30 S субчастицей

(Условия опытов: C<sub>трис-НСl</sub> = 0,01 M, C<sub>MgCl<sub>2</sub></sub> = 0,02 M, pH 7,2, t = 24°)

|           | NH <sub>4</sub> Cl | KCl | RbCl | CsCl | LiCl | NaCl |
|-----------|--------------------|-----|------|------|------|------|
| С полиУ   | 840                | 680 | 610  | 590  | 400  | 290  |
| Без полиУ | 140                | 130 | 70   | 70   | 70   | 70   |

фическое связывание в значительной мере может зависеть от ионных условий среды (1). Целью настоящей работы было изучение влияния различных одно- и двухвалентных катионов на специфическое связывание фенилаланил-тРНК с изолированной субчастицей 30 S в присутствии полиуридиловой кислоты (полиУ).

В работе использовали препараты полиУ (K<sup>+</sup>-соль) фирмы «Реанал» (Венгрия). Меченую С<sup>14</sup>-фенилаланил-тРНК получали как описано ранее (2). 30 S субчастицы получали путем диссоциации 70 S рибосом, выделенных из *E. coli*, штамм MRE-600, и последующего разделения субчастиц путем центрифугирования в сахарозном градиенте; рибосомные субчастицы высаливали из фракции сахарозного градиента с помощью (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3). 30 S субчастицы, хранившиеся в виде осадка под (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, перед опытом центрифугировали 1 час при 15 000 об/мин, суспендировали в соответствующем буфере и диализовали дважды по 40 мин. против этого же буфера. Затем субчастицы освобождали от агрегатов центрифугированием 30 мин. при 10 000 об/мин.

Концентрации 30 S субчастиц, полиУ и С<sup>14</sup>-фенилаланил-тРНК в каждой серии опытов были строго одинаковы. Проба в объеме 0,3 мл состояла из следующих компонентов: 30 S субчастицы (20 — 28 мкг); полиУ (40 мкг); С<sup>14</sup>-фенилаланил-тРНК (40 мкг). Концентрация трис-буфера в системе была 0,01 M, pH 7,2—7,4. В разных опытах брали различные одно- и двухвалентные катионы в меняющихся концентрациях. В каждом варианте опытов ставились контроли на неспецифическое связывание фенилаланил-тРНК с 30 S субчастицей в отсутствие полиУ. Инкубацию проб проводили в течение 20 мин. при 24° С (или, в некоторых сериях опытов, при 4°). Затем пробы быстро охлаждали во льду и добавляли по 3 мл холодного буфера, в котором проводили опыт. Комплексы наносили на нитроцеллюлозные фильтры, промывали три раза 2 мл соответствующего буфера, высушивали и считали их радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Карботриметр» (Франция). Величины специфического связывания

(в имп/мин на пробу) при различных концентрациях разных катионов приведены в табл. 1, 2 и 3.

Данные табл. 1 свидетельствуют о том, что из испытанных одновалентных катионов  $\text{NH}_4^+$  обеспечивает наиболее высокое специфическое связывание  $\text{C}^{14}$ -фенилаланил-тРНК с 30 S субчастицей и полиУ. Это специфическое связывание заметно уменьшается в ряду  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , при этом с  $\text{Li}^+$  и  $\text{Na}^+$  оно уменьшается особенно существенно, в 2—3 раза. В отношении двухвалентных катионов следует заметить, что

Таблица 2

Влияние двухвалентных катионов (концентрация вводимых солей 0,02 M) на специфическое связывание, имп/мин,  $\text{C}^{14}$ -фенилаланил-тРНК с 30 S субчастицей (Условия опытов:  $C_{\text{трис-НCl}} = 0,01 \text{ M}$ ,  $C_{\text{NH}_4\text{Cl}} = 0,1 \text{ M}$ , pH 7,2)

|             | MgCl <sub>2</sub> | CaCl <sub>2</sub> | MnCl <sub>2</sub> | NiCl <sub>2</sub> |            | MgCl <sub>2</sub> | CaCl <sub>2</sub> | MnCl <sub>2</sub> | NiCl <sub>2</sub> |
|-------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 24° С полиУ | 1030              | 1670              | 1730              | 70                | 4° С полиУ | 870               | 1280              | 1260              | 70                |
| Без полиУ   | 310               | 330               | 350               | 70                | Без полиУ  | 260               | 500               | 300               | 70                |

Таблица 3

Влияние малых концентраций двухвалентных катионов на фоне значительной концентрации  $\text{Mg}^{2+}$  на специфическое связывание, имп/мин,  $\text{C}^{14}$ -фенилаланил-тРНК с 30 S субчастицей

(Условия опытов:  $C_{\text{трис-НCl}} = 0,01 \text{ M}$ ,  $C_{\text{NH}_4\text{Cl}} = 0,1 \text{ M}$ , pH 7,2;  $t = 24^\circ$ )

|                | MgCl <sub>2</sub><br>(0,01 M) | MgCl <sub>2</sub> (0,009 M)<br>спермидин<br>(0,001 M) | MgCl <sub>2</sub> (0,009 M)<br>CaCl <sub>2</sub> (0,001 M) | MgCl <sub>2</sub> (0,009 M)<br>MnCl <sub>2</sub> (0,001 M) | MgCl <sub>2</sub> (0,009 M)<br>NiCl <sub>2</sub> (0,001 M) | MgCl <sub>2</sub> (0,009 M)<br>ZnCl <sub>2</sub> (0,001 M) |
|----------------|-------------------------------|---|--|--|--|--|
| Опыт 1 С полиУ | 510                           | 660   | 570  | 460  | 90   | 70   |
| Без полиУ      | 90                            | 110   | 110  | 100  | 70   | 70   |
| Опыт 2 С полиУ | —                             | 980   | 870  | 980  | 120  | 130  |
| Без полиУ      | —                             | 100   | 110  | 110  | 60   | 80   |

для образования тройственного комплекса требуются сравнительно высокие концентрации  $\text{Mg}^{2+}$ ; так, при 0,02 M  $\text{Mg}^{2+}$  специфическое связывание происходит полнее, чем при 0,01 M  $\text{Mg}^{2+}$  (табл. 2, 3).  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  при их концентрации 0,02 M не только вполне заменяют  $\text{Mg}^{2+}$ , но и обеспечивают даже существенную стимуляцию специфического связывания. Наоборот, при замене  $\text{Mg}^{2+}$  на  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  в концентрации 0,02 M специфического связывания не происходит (табл. 2).

Предполагая, что высокие концентрации  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  могут как-то отрицательно действовать на саму структуру 30 S, мы попытались обнаружить эффект этих двухвалентных катионов, вводя их в систему в небольших количествах (0,001 M) на фоне довольно высокого содержания  $\text{Mg}^{2+}$  (0,009 M). Однако в этих условиях  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  также значительно ингибировали образование комплексов (табл. 3).  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и спермидин на фоне  $\text{Mg}^{2+}$  не оказывали заметного влияния на специфическое связывание (табл. 3).

Опыты, проведенные при 4°, показали, что специфические комплексы могут образовываться и при этой температуре, правда с несколько меньшей эффективностью, чем при 24° (табл. 2). Во всех случаях наблюдали некоторое связывание фенилаланил-тРНК с 30 S частицами и в отсутствие полиУ (до 20% от связывания в присутствии полиУ). Не исключено, что это объясняется примесью 50 S в препаратах 30 S субчастиц.

Итак, в условиях описанного эксперимента образование специфического комплекса 30 S субчастица — фенилаланил-тРНК — полиуридиловая кислота происходит как в присутствии 0,1 M  $\text{NH}_4^+$  или  $\text{K}^+$ , так и 0,1 M  $\text{Rb}^+$

или  $\text{Cs}^+$ . Эти ионы можно, по-видимому, считать более или менее взаимозаменяемыми, хотя небольшое уменьшение эффективности в ряду  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  все же наблюдается. Аналогичный ряд ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ) был отмечен ранее по способности катионов активировать 30 S субчастицы для специфического связывания аминоацил-тРНК (<sup>1</sup>). Замена этих ионов на  $\text{Li}^+$  или  $\text{Na}^+$  в той же концентрации (0,1 M) существенно ингибирует образование комплекса, что согласуется с данными других исследователей, изучавших специфическое связывание аминоацил-тРНК как с полными 70 S рибосомами (<sup>2-7</sup>), так и с изолированными 30 S субчастицами (<sup>1, 8</sup>).

Двухвалентные катионы  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  вполне взаимозаменяемы для образования комплекса, при этом  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  даже более эффективны, чем  $\text{Mg}^{2+}$ . Наоборот,  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  даже в малой концентрации (0,001 M) на фоне значительной концентрации  $\text{Mg}^{2+}$  практически нацело ингибируют специфическое связывание фенилаланил-тРНК с 30 S субчастицей.

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

Поступило  
23 III 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> А. С. Спириц, Л. П. Гаврилова, Рибосома, «Наука», 1968. <sup>2</sup> А. С. Богатырева, Э. Н. Трифонов, А. С. Спириц, ДАН, 195, 213 (1970). <sup>3</sup> N. V. Belitsina, A. S. Spirin, J. Mol. Biol., 52, 45 (1970). <sup>4</sup> A. Zamir, R. Miskin, D. Elson, FEBS Letters, 3, 85 (1969). <sup>5</sup> G. J. Spyrides, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 51, 1220 (1964). <sup>6</sup> I. Suzuka, A. Kaji, J. Biol. Chem., 243, 3136 (1968). <sup>7</sup> G. R. Philipps, J. Biol. Chem., 245, 859 (1970). <sup>8</sup> I. Suzuka, H. Kaji, A. Kaji, Biochem. Biophys. Res. Commun., 21, 187 (1965).