

Н. В. БЕЛИЦИНА, М. А. ГЛУХОВА, академик А. С. СПИРИН

**ДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФИЗИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ
ФАКТОРОВ НА СПЕЦИФИЧЕСКОЕ (КОДОН-ЗАВИСИМОЕ)
СВЯЗЫВАНИЕ АМИНОАЦИЛ-тРНК С ИЗОЛИРОВАННОЙ 30S
РИБОСОМНОЙ СУБЧАСТИЦЕЙ**

Из литературы известно, что ряд факторов, такие как ионная сила, двувалентные катионы, температура, влияют на специфическое (кодон-зависимое) связывание фенилаланил-тРНК с 30S рибосомной субчастицей (1-4). Однако на основании этих данных не ясно, что меняется в ответ на изменение условий среды — прочность комплекса или доля 30S субчастиц, способных связать аминоксил-тРНК.

В настоящей работе предложен метод определения константы стабильности комплекса 30S · полиуридиловая кислота фенилаланил-тРНК и доли активных субчастиц. Было изучено действие ряда факторов, таких как температура, ионная сила ($[K^+]$), концентрация Mg^{2+} , этанол, мочеви́на, парахлормеркурибензоат (ПХМБ). Выбранные факторы интересны, поскольку сдвигают равновесие в реакции ассоциации — диссоциации субчастиц (5), а также влияют на работу рибосом в полной бесклеточной системе синтеза полипептида (5) и в системе «неэнзиматической» трансляции (6).

Если реакция образования кодон-зависимого комплекса 30S субчастицы с C^{14} -фенилаланил-тРНК обратима, то константа стабильности комплекса выражается уравнением

$$K = \frac{[30S \cdot C^{14}\text{-фенилаланил-тРНК}]}{[30S] \cdot [C^{14}\text{-фенилаланил-тРНК}]}, \quad (1)$$

где $[30S \cdot C^{14}\text{-фенилаланил-тРНК}]$ — концентрация комплексов в равновесии, $[30S]$ — концентрация свободных субчастиц в равновесии, $[C^{14}\text{-фенилаланил-тРНК}]$ — концентрация свободной аминоксил-тРНК в равновесии. Если половина всех «активных» 30S субчастиц вошла в комплекс, то уравнение (1) примет следующий вид:

$$K = \frac{1}{[C^{14}\text{-фенилаланил-тРНК}]}. \quad (2)$$

Таким образом, по наклону кривых зависимости образования специфического комплекса от количества C^{14} -фенилаланил-тРНК можно определять

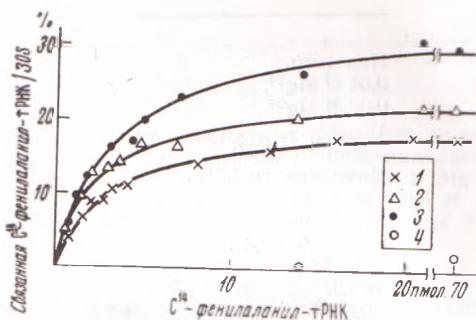


Рис. 1. Влияние концентрации ионов Mg^{2+} на специфическое связывание C^{14} -фенилаланил-тРНК с 30S субчастицей. 1 — 0,005 M Mg^{2+} , 2 — 0,01 M Mg^{2+} , 3 — 0,02 M Mg^{2+} , 4 — неспецифическое связывание при 0,02 M Mg^{2+}

константу стабильности комплексов. Уровень плато на кривых связывания C^{14} -фенилаланил-тРНК соответствует насыщению препарата 30 S субчастиц C^{14} -фенилаланил-тРНК и, следовательно, отражает количество активных 30 S субчастиц.

Изменение константы стабильности изучаемого комплекса в присутствии фактора определяли при $0,005 M Mg^{2+}$. В этих условиях константа связывания такова, что часть C^{14} -фенилаланил-тРНК остается свободной (рис. 1). Величину константы стабильности и долю активных 30 S субчастиц определяли при следующих допущениях: 1) на 30 S субчастице имеется всего лишь одно место для связывания одной молекулы тРНК; 2) фенилаланиновая тРНК в используемых препаратах тотальной тРНК ацилирована C^{14} -фенилаланином на 100%.

Таблица 1

Влияние условий среды на специфическое (кодон-зависимое) связывание C^{14} -фенилаланил-тРНК с 30 S рибосомными субчастицами

Условия опыта *	Доля «активных» 30S, %	K, 1/M
Контроль	18	$2 \cdot 10^8$
$0,01 M Mg^{2+}$	22	$5 \cdot 10^8$
$0,02 M Mg^{2+}$	30	$4,5 \cdot 10^8$
4°	18	10^9
Этанол (0,5 M)	23	$4 \cdot 10^8$
Мочевина (0,5 M)	13	$5 \cdot 10^7$
$0,05 M K^+$	19	$2,5 \cdot 10^8$
$0,2 M K^-$	8	$6 \cdot 10^7$
ПХМБ (0,0001 M)	9	$2 \cdot 10^7$
$0,02 M Mg^{2+}; 0,2 M K^+$	27	$3,5 \cdot 10^8$
$0,02 M Mg^{2+};$ мочеви́на (0,5 M)	28	$4 \cdot 10^8$
$0,02 M Mg^{2+};$ ПХМБ (0,0001 M)	15	$4 \cdot 10^8$

* Указаны факторы, которые в данном эксперименте вводились в инкубационную смесь или менялись по сравнению с контролем (контроль: $0,005 M Mg^{2+}; 0,1 M K^+$; температура реакционной смеси 25°).

30 S субчастицы получали из рибосом *E. coli* MRE-600 путем зонального центрифугирования (⁷). Используемые препараты 30 S субчастиц были гомогенны при анализе в ультрацентрифуге; примесь 50 S субчастиц составляла не более 2—3% по данным анализа в полной бесклеточной белок-синтезирующей системе. Перед опытом 30 S субчастицы, хранившиеся в виде осадка под $(NH_4)_2SO_4$ диализовали против $0,01 M$ трис-HCl-буфера (pH₂₅ 7,1—7,2), содержащего $0,02 M MgCl_2$ и $0,1 M KCl$ (⁷).

C^{14} -фенилаланил-тРНК была получена энзиматическим аминокислотированием тотальной тРНК *E. coli* C^{14} -фенилаланином с удельной активностью 513 С/моль, фирма «Амершем», Англия (⁸). Удельная активность препаратов тРНК составляла $0,75 \cdot 10^6$ — $1,03 \cdot 10^6$ расп/мин·мг. Количество тРНК определяли по поглощению при 260 нм, считая, что 1 о. е. соответствует 44 мкг тРНК (⁹).

В используемых препаратах C^{14} -фенилаланил-тРНК всегда определяли процент активных молекул C^{14} -фенилаланил-тРНК, т. е. молекул, способных давать комплекс с 30 S субчастицей, путем титрования C^{14} -фенилаланил-тРНК 30 S субчастицами; активная доля составляла 70—73% от общего количества молекул C^{14} -фенилаланил-тРНК в наших препаратах. Таким образом, наши препараты содержали 460—660 пмол. активной C^{14} -фенилаланил-тРНК на 1 мг тотальной тРНК.

Для изучения влияния различных факторов среды на связывание C^{14} -фенилаланил-тРНК с 30S субчастицами в присутствии полиуридиловой кислоты (полиУ) была использована стандартная инкубационная смесь. 0,2 мл смеси содержали 0,01 M трис-HCl-буфер (pH_{25°} 7,1—7,2, в соответствующих экспериментах pH_{4°} 7,1—7,2), MgCl₂, KCl, 10 мкг (12,5 пмолей) 30S субчастиц, 0,8—150 мкг (0,5—100 пмолей) C^{14} -фенилаланил-тРНК, 10 мкг полиУ. ПолиУ всегда была в большом избытке. Пробы инкубировали 25 мин. при 25° или при 4°. Во всех случаях было специально показано, что это время достаточно для установления равновесия. Количество связанной C^{14} -фенилаланил-тРНК с 30S субчастицей определяли путем адсорбции комплексов на нитроцеллюлозных фильтрах по методу Ниренберга и Ледера (¹). Радиоактивность фильтров считали в стандартной смеси толуол — РРО — РОРОР в сцинтилляционном счетчике «Трикарб», фирма «Паккард».

Был проведен ряд стандартных экспериментов, заключавшихся в титровании 30S субчастиц C^{14} -фенилаланил-тРНК в присутствии полиУ. Фактор, влияние которого изучали, непосредственно добавляли к инкубационной смеси. Неспецифическое (без матричного полинуклеотида) связывание C^{14} -фенилаланил-тРНК составляло 3—7% от специфического (в присутствии полиУ). Результаты экспериментов представлены на рис. 1 и 2. Константы ассоциации C^{14} -фенилаланил-тРНК с 30S субчастицами и доля активных частиц даны в табл. 1. Использованные препараты 30S субчастиц были полностью «активированными» (¹⁰): во всех случаях дополнительный прогрев этих частиц при 37° в течение 40 мин. в 0,01 M трис-HCl-буфере (pH_{37°} 7,1—7,2), содержащем 0,002 M дитиотреитола, 0,02 M MgCl₂, 0,2 M KCl, не приводил к увеличению активности препарата.

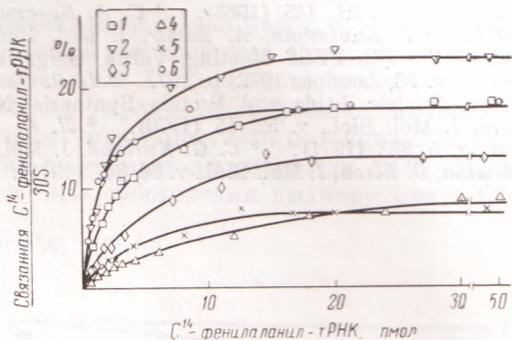


Рис. 2. Влияние различных факторов на специфическое связывание C^{14} -фенилаланил-тРНК с 30S субчастицей при 0,005 M MgCl₂. 1 — контроль, 2 — 0,5 M этанол, 3 — 0,5 M мочевины, 4 — 0,0001 M ПХМБ, 5 — 0,2 M KCl, 6 — 4°

Из табл. 1 видно следующее.

1) Увеличение концентрации Mg²⁺ в среде от 0,005 M до 0,02 M заметно увеличивает долю активных 30S субчастиц и константу связывания аминопацил-тРНК с 30S субчастицами.

2) При снижении температуры реакционной смеси от 25 до 4° доля активных частиц не изменяется, но константа связывания сильно возрастает.

3) Увеличение концентрации одновалентных катионов (K⁺) от 0,1 до 0,2 M при низкой концентрации Mg²⁺ (0,005 M) сильно уменьшает как долю активных 30S субчастиц, так и константу связывания. Такое же увеличение концентрации K⁺ при 0,02 M Mg²⁺ не изменяет обоих этих показателей. Изменения в пределах от 0,05 M до 0,1 M K⁺ не изменяют ни доли активных частиц, ни константы связывания.

4) Добавление этанола (0,5 M) в среду увеличивает долю активных частиц и константу связывания.

5) Добавление мочевины (0,5 M) в среду при малой концентрации Mg²⁺ (0,005 M) несколько уменьшает долю активных частиц и сильно уменьшает константу связывания. Та же концентрация мочевины при 0,02 M Mg²⁺ не изменяет существенно оба эти показателя.

6) Обработка препарата 30S субчастиц ПХМБ (10^{-4} M) приблизительно вдвое снижает долю активных частиц и в 10 раз снижает константу связывания активных частиц с аминоксил-тРНК.

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

Поступило
1 III 1974

Институт белка
Академии наук СССР
Пушкино-на-Оке

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Nirenberg, P. Leder, Science, v. 145, 1399 (1964). ² S. Pestka, M. Nirenberg, J. Mol. Biol., v. 21, 145 (1966). ³ С. А. Богатырева, А. С. Спирин, ДАН, т. 200, 722 (1971). ⁴ J. Kaufmann, A. Zamir, J. Mol. Biol. v. 69, 357 (1972). ⁵ A. S. Spirin, Proc. of the 7-th FEBS Meeting, Varna, Bulgaria, September 20-25, 1971. FEBS Symposium, v. 23, London, 1972, p. 197. ⁶ L. P. Gavrilova, A. S. Spirin, Methods in Enzymology, Nucleic Acids and Protein Synthesis, N. Y., 1973. ⁷ N. V. Belitsina, A. S. Spirin, J. Mol. Biol., v. 52, 45 (1970). ⁸ Л. П. Гаврилова, В. В. Смолянинов, Мол. биол., т. 5, 883 (1971). ⁹ C. G. Kurland, J. Mol. Biol., v. 18, 90 (1966). ¹⁰ A. Zamir, R. Miskin, D. Elson, J. Mol. Biol., v. 60, 347 (1971).