

А. С. ГИРШОВИЧ, Е. С. БОЧКАРЕВА

## АФФИННОЕ АЛКИЛИРОВАНИЕ 30 S-СУБЧАСТИЦЫ РИБОСОМ E. COLI

(Представлено академиком А. С. Спириным 12 IV 1974)

Нами впервые <sup>(1)</sup> было предложено использование производных аминоксил-тРНК, модифицированных по аминогруппе аминоксильного остатка для аффинной химической модификации тРНК-связывающих центров рибосомы. В настоящем сообщении приведены результаты алкилирования рибосомальной 30S-субчастицы аффинным агентом N-бромацетил-[<sup>14</sup>C]-фенилаланил-тРНК, специфично реагирующим с SH-группами белков.

Аминоацилирование тРНК из *Escherichia coli* MRE 600 <sup>14</sup>C-фенилаланином (удельная активность 200 С/моль, ЧССР) проводили как обычно <sup>(2)</sup>. Препарат 30S-субчастиц любезно предоставлен Н. В. Белидиной. ПолиУ-препарат фирмы «Реанал» (ЧССР). N-бромацетилирование <sup>14</sup>C-фенилаланил-тРНК проводили по Липидоту <sup>(3)</sup> с использованием N-оксисукцинимидного эфира бромуксусной кислоты. Выход бромацетильного производного, определенный по Шофильду и Замечнику <sup>(4)</sup>, составил 85–90%. Условия образования тройного комплекса стандартные (20 мин., 25°). Состав инкубационной смеси (1 мл): 1,3 мг 30S-субчастиц, 0,5 мг N-бромацетил-<sup>14</sup>C-фенилаланил-тРНК, 1 мг полиУ, 100 мкмол. KCl, 10 мкмол. N-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновой кислоты, pH 7,2, и 20 мкмол. MgCl<sub>2</sub>. В этих условиях связывание аффинного реагента составляет 75–80%. В отсутствие полиУ связывание падает до 9–14%, что свидетельствует в пользу специфичности образования тройного комплекса. Степень алкилирования 30S-белков определяли анализом радиоактивности в осадке после инкубации пробы в присутствии 5% ТХУ в течение 20 мин. при 90°. При инкубации выделенного комплекса при 25° в течение 20 час. до 4–5% реагента остается ковалентно связанным с 30S-субчастицей. В соответствии с вышеприведенными данными по специфичности образования комплекса инкубация реагента с 30S-субчастицей в отсутствие полиУ в аналогичных условиях приводит к 4–5-кратному снижению степени алкилирования 30S-белков.

По окончании реакции к инкубационной смеси добавляли β-меркаптоэтанол для инактивации реагента и деацилировали тРНК либо инкубацией при 37° в течение 2 час. при pH 10,5, либо обработкой панкреатической рибонуклеазой (1 : 50, 37°, 2 часа). Тотальный 30S-белок выделяли экстракцией ледяной СН<sub>3</sub>СООН и после лиофилизации хроматографировали по Харди <sup>(5)</sup> на фосфоцеллюлозе фирмы «Ватман» в микроварианте: колонка 0,6 × 60 см, объем градиента 300 мл, скорость элюции 2,5 мл/час, количество белка 2–5 мг, объем фракции 0,5–1,5 мл. Видно (рис. 1), что радиоактивность распределена крайне неравномерно. Четко виден один основной довольно симметричный пик, содержащий до 50% внесенной радиоактивности. Фракции этого пика были объединены и проанализированы двумерным электрофорезом в полиакриламидном геле в условиях Кальтшмидта и Витмана <sup>(6)</sup>. Счет радиоактивности проводили после сжигания геля в смеси Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>+NH<sub>3</sub> <sup>(7)</sup> в тритон-Х-100-толуольном сцинтилляторе на счетчике «ТриКарб» модель 3320 (фирма «Паккард»).

Оказалось, что из 5 белков, элюирующихся в районе основного  $^{14}\text{C}$ -пика (S12, S13, S14, S15 и S19), радиоактивность содержится практически в одном белке S13 (до 90%). Алкилирование 30S-субчастицы аффинным реагентом в отсутствие полиУ приводит к снижению радиоактивности в белке S13 до уровня радиоактивности остальных белков.

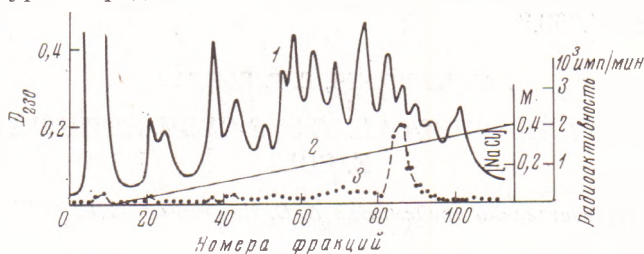


Рис. 1. Хроматография рибосомальных белков на фосфоцеллюлозе по Харди<sup>(5)</sup> после аффинного алкилирования 30S-субчастицы в составе специфического тройного комплекса с N-бромацетил- $^{14}\text{C}$ -фенилаланил-tРНК и полиУ. 1 —  $D_{2\text{SO}}$ , 2 — концентрация NaCl, 3 — радиоактивность

Таким образом, можно заключить, что белок S13 расположен на поверхности 30S-субчастицы вблизи акцепторного конца тРНК и в выбранных условиях является, по-видимому, единственным белком этого района, содержащим экспонированную SH-группу.

Приносим благодарность Л. Ф. Марковой за проведение двумерного электрофореза в полиакриламидном геле.

Институт белка  
Академии наук СССР  
Пушино-на-Оке

Поступило  
9 IV 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> E. S. Bochkareva, V. G. Budker et al., FEBS Letters, v. 19, 121 (1971). <sup>2</sup> Д. Г. Кнорре, В. И. Сиротюк, Л. Е. Стефанович, Молекулярная биол., т. 1, 837 (1967). <sup>3</sup> Y. Lapidot, N. de Groot et al., Biochim. et biophys. acta, v. 149, 532 (1967). <sup>4</sup> P. Schofield, P. Zamecnik, Biochim. et biophys. acta, v. 155, 410 (1968). <sup>5</sup> S. Y. S. Hardy, C. G. Kurland et al., Biochemistry, v. 8, 2897 (1969). <sup>6</sup> E. Kaltschmidt, H. G. Wittmann, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 67, 1276 (1970). <sup>7</sup> D. Goodman, H. Matzura, Anal. Biochem., v. 42, 481 (1971).