

С. Е. БРЕСЛЕР, Г. П. ВЛАСОВ, С. В. КИРИЛЛОВ,
Ю. П. СЕМЕНКОВ, В. П. МАХНО

**НЕФЕРМЕНТАТИВНОЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЕ (КОДОН-ЗАВИСИМОЕ)
СВЯЗЫВАНИЕ тРНК С ИЗОЛИРОВАННОЙ 30 S
РИБОСОМНОЙ СУБЪЕДИНИЦЕЙ.
ИЗМЕРЕНИЕ КОНСТАНТ ДИССОЦИАЦИИ КОМПЛЕКСА**

(Представлено академиком А. А. Баевым 28 X 1974)

При изучении специфического связывания аминокислот-тРНК с изолированной 30S рибосомной субъединицей многие авторы наблюдали, что только малая часть 30S субъединиц оказывается активной (¹⁻⁵). Вероятными причинами малой активности 30S субъединиц считают: 1) конкурентное связывание деацилированной специфической тРНК (какющаяся потеря активности (^{1, 3})); 2) потерю при выделении частью рибосом некоторых белков, необходимых для связывания матрицы и тРНК (⁶⁻⁸); 3) функциональную гетерогенность рибосом, отражающую их физическую гетерогенность (⁹).

В настоящей работе первая причина была устранена путем применения для измерения специфического связывания по полирибидиловой кислоте обогащенных препаратов С¹⁴-фенилаланил-тРНК^{фал}, в которых полностью отсутствовала деацилированная тРНК^{фал}, или обогащенных препаратов деацилированной Р³²-тРНК^{фал} с известным содержанием Р³²-тРНК^{фал}. Были найдены оптимальные условия (рост клеток, концентрация Mg²⁺, хлористого аммония, время отмывки) для выделения активных 30S субъединиц рибосом *Escherichia coli*.

В результате приготовленные нами препараты 30S субъединиц обладают 80—100% активностью в специфическом матричном связывании фенилаланил-тРНК^{фал}, пептидил-тРНК^{фал} и деацилированной тРНК^{фал}. Реакция образования кодон-зависимого комплекса 30S субъединицы и поли-У с фенилаланил-тРНК^{фал} полностью обратима. Были измерены константы диссоциации комплекса при 30 и 0°, а также зависимость константы диссоциации от концентрации ионов магния и аммония в реакционной среде.

Препараты рибосомных субъединиц получены следующим способом. Рибосомы из грубого экстракта клеток штамма *E. coli* MRE-600 осаждали в 0,02 M трис-НСl буфере (рН 7,5), содержащем 0,01 M MgCl₂, 0,1 M NH₄Cl, 0,0005 M ЭДТА, 0,003 M 2-меркаптоэтанол, и диализовали против 0,02 M трис-НСl буфера (рН 7,5), содержащего 0,001 M MgCl₂, 0,5 M NH₄Cl, 0,00005 M ЭДТА, 0,003 M 2-меркаптоэтанол. Затем субъединицы разделяли зональным центрифугированием в угловом роторе в буфере, используемом для диализа с градиентом сахарозы 15—30%. Фракции 30S пика из градиента, содержащие не более 0,5% примеси 50S субъединиц, объединяли и хранили замороженными в жидком азоте. Перед опытом проводили реактивацию субъединиц путем нагревания в течение 40 мин. при 40° в 0,02 M трис-НСl буфере (рН 7,0), содержащем 0,02 M MgCl₂, 0,2 M NH₄Cl, 0,001 M ЭДТА, 0,003 M 2-меркаптоэтанол.

Субъединицы 30S не теряли активности при осаждении на холоду 0,6 объемами этанола и повторном центрифугировании в градиенте сахарозы в буфере, используемом для реактивации.

Получение P^{32} -тРНК и немеченой тРНК из *E. coli* В и ее аминоацилирование, а также синтез C^{14} -пептидил-тРНК (формилглицилглицил- C^{14} -фенилаланил-тРНК) проводили, как описано ранее (10). Обогащение C^{14} -фенилаланил-тРНК^{фал} и C^{14} -пептидил-тРНК^{фал} проводили на изготовленной в лаборатории бензоилированной ДЭАЭ-целлюлозе (11). Для получения обогащенной деацелированной P^{32} -тРНК^{фал} в начале обогащали аминоацил-тРНК^{фал} с двойной меткой C^{14} -фенилаланил- P^{32} -тРНК^{фал}, а затем деацелировали ее путем инкубации в 0,5 М трис-НСl (рН 8,8) при 37° в течение 40 мин. По C^{14} -радиоактивности препарата до деацелирования измеряли количество специфической P^{32} -тРНК^{фал} в препарате. Удельная радиоактивность P^{32} -тРНК составляла 500 имп/мин·пмоль.

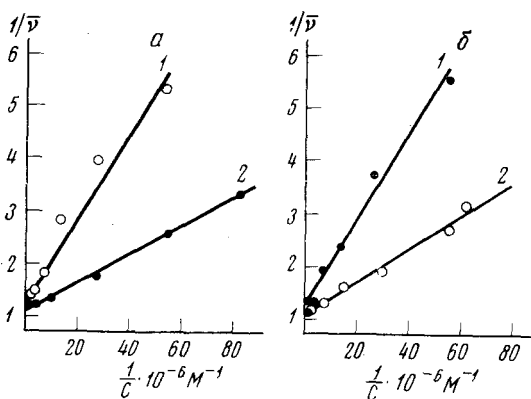


Рис. 1

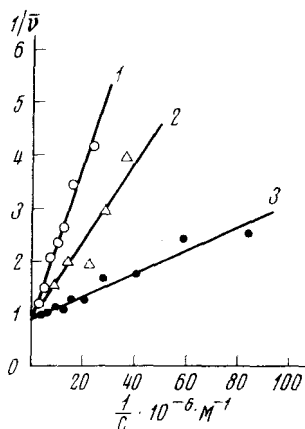


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость связывания с 30S субъединицами специфической тРНК от ее концентрации в растворе. а — C^{14} -пептидил-тРНК^{фал} при 30° (1) и C^{14} -фенилаланил-тРНК^{фал} при 0° (2), б — P^{32} -тРНК^{фал} при 30° (1) и при 0° (2)

Рис. 2. Зависимость связывания с 30S субъединицами C^{14} -фенилаланил-тРНК^{фал} от ее концентрации при различных концентрациях ионов магния, при 0°. 1 — 0,005 М Mg^{2+} , 2 — 0,010 М Mg^{2+} , 3 — 0,020 М Mg^{2+}

В экспериментах использовали C^{14} -фенилаланин с удельной радиоактивностью 1650 мС/мг (Чехословакия). Это давало 500 имп/мин·пмоль при счете на нитроцеллюлозном фильтре в стандартном сцинтилятороме толуол — ППО — ПОПОП в сцинтиляционном счетчике «Isoscap 300» фирмы «Nuclear Chicago». Обогащенные препараты содержали 500—600 пмол. C^{14} -фенилаланина на 1 о.е. тРНК. При наличии избытка 30S субъединиц более 95% C^{14} -фенилаланил-тРНК^{фал} и C^{14} -пептидил-тРНК^{фал} связывались с рибосомами. Количества тРНК и рибосом определяли по поглощению при λ 260 нм, считая, что 1 о.е. соответствует 1600 пмол. для тРНК и 75 пмол. для 30S субъединиц (12). Неспецифическое связывание обогащенных C^{14} -фенилаланил-тРНК^{фал} и C^{14} -пептидил-тРНК^{фал} (контроль без поли-У) составляло 2—4% от специфического при максимальных концентрациях C^{14} -фенилаланил-тРНК^{фал}. Контроль с поли-У, но с обедненной по тРНК^{фал} деацелированной P^{32} -тРНК составлял 1—2%, контроль с поли-У, но с обогащенной C^{14} -тирозил-тРНК^{тир} был равен 5%.

Для измерения зависимости связывания специфической тРНК от ее концентрации в растворе применяли два метода, давших полностью совпадающие результаты. В первом случае к стандартной смеси 10 пмол. 30S субъединиц, 10 мкг поли-У (фирмы Реанал, Венгрия) добавляли одинаковые количества 20 (40) пмол. C^{14} -фенилаланил-тРНК^{фал} (C^{14} -пептидил-тРНК^{фал} или деацелированной P^{32} -тРНК^{фал}) в буфере, используемом для реактивации (в некоторых опытах изменяли концентрацию Mg^{2+} или NH_4^+) так, чтобы конечный объем смеси варьировал от 25 мкл до

15 мл. Во втором случае к 10 пмол. 30S субъединиц и 10 мкг поли-У добавляли меняющиеся количества фенилаланил-тРНК^{фал} в том же буфере так, чтобы объем смеси сохранялся постоянным (обычно 25—50 мкл).

Инкубацию проводили 60 мин. при 0 и 30°. Специальные кинетические измерения показали, что этого времени вполне достаточно для достижения равновесия. Количество тРНК^{фал}, связанной с 30S субъединицами, определяли путем адсорбции комплекса на нитроцеллюлозных фильтрах по методу Ниренберга и Ледера (¹³). Фильтрование проводили при температуре опыта, а промывали фильтры тем же буфером, но охлажденным до 0°. Вычисляли концентрацию свободной тРНК^{фал} в растворе и строили зависимость среднего количества молей тРНК^{фал}, свя-

Таблица 1

Константы диссоциации специфического комплекса (30S субъединица, поли-У) — тРНК^{фал} при разных условиях

тРНК	Т-ра, °С	[Mg ²⁺], мМ	[NH ₄ ⁺], мМ	$K \cdot 10^{-8}$, 1/М	Число активных рибосом в опыте, %
C ¹⁴ -фенилаланил-тРНК ^{фал}	0	20	200	3,1 ± 0,3 *	90
C ¹⁴ -пептидил-тРНК ^{фал}	0	20	200	2,8 ± 0,4 *	95
	30	20	200	6,3	80
P ³² -тРНК ^{фал}	0	20	200	2,8	90
	30	20	200	8,1	81
C ¹⁴ -фенилаланил-тРНК ^{фал}	0	5	200	16,6	112
	0	5	100	11,00	115
	0	5	50	10,5	94
	0	10	200	9,3	116
	0	20	200	2,5	113
	0	20	100	1,0	95
	0	20	50	0,9	85

* Стандартная ошибка определена по 6 независимым экспериментам.

занного с 1 мол. 30S субъединиц (\bar{v}), от концентрации свободной тРНК^{фал} (C) в обратных координатах (рис. 1, 2).

Эти зависимости носят линейный характер и могут быть описаны уравнением изотермы Лэнгмюра: $\bar{v} = MC / (K + C)$, где K — константа диссоциации комплекса, а M — количество связывающих мест на рибосоме.

Доказательства обратимости процесса были получены в прямом эксперименте, путем диссоциации комплекса при разбавлении и в опыте по обмену C¹⁴-фенилаланил-тРНК^{фал} (P³²-тРНК^{фал}) из комплекса с немеченой фенилаланил-тРНК^{фал} или тРНК^{фал} из раствора. При 30° за 60 мин. обмен достигал 90%. Результаты измерений констант диссоциации комплекса представлены в табл. 1.

Из рис. 1, 2 и табл. 1 видно следующее. 1. При больших концентрациях во всех случаях $1/\bar{v}$ стремится к 1 с возможной погрешностью ±15%. Если считать, что на 30S субъединице имеется только одно место для связывания тРНК, то все рибосомы в препарате активны и связывают по одной молекуле аминокцил-, пептидил-, или деацилированной тРНК^{фал} при достаточно высоких их концентрациях в равной мере при 30 и 0°. 2. Константы диссоциации при 0,02M Mg²⁺ для аминокцил-тРНК^{фал}, пептидил-тРНК^{фал} и деацилированной тРНК^{фал} практически одинаковы. 3. При уменьшении концентрации ионов магния константа связывания комплекса сильно падает, но все рибосомные субъединицы 30S остаются активными. 4. Изменение концентрации ионов аммония от 0,05 до 0,2M не изменяет количества активных рибосом; константа диссоциации комплекса при постоянной концентрации ионов магния слабо

зависит от концентрации ионов аммония (табл. 1). 5. Рибосомные субъединицы гомогенны в матричном специфическом связывании по крайней мере на 80% (80% или больше субъединиц имеют одну и ту же константу диссоциации комплекса).

Ленинградский институт ядерной физики
им. Б. П. Константинова
Академии наук СССР
Гатчина

Поступило
28 X 1974

Институт высокомолекулярных соединений
Академии наук СССР
Ленинград

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. Pestka, M. Nirenberg, J. Mol. Biol., v. 21, 145 (1966). ² P. Traub, M. Nomura, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 59, 777 (1968). ³ A. Zamir, R. Miskin, D. Elson, J. Mol. Biol., v. 60, 347 (1971). ⁴ J. Kaufmann, A. Zamir, J. Mol. Biol., v. 69, 357 (1972). ⁵ Н. В. Белицина, М. А. Глухова, А. С. Спириг. ДАН. т. 216, 925 (1974). ⁶ J. van Duin, C. G. Kurland, Molec. Gen. Genet., v. 109, 169 (1970). ⁷ M. Smolarsky, M. Tal, Biochim. et biophys. acta, v. 213, 401 (1970). ⁸ L. L. Randall-Hazelbauer, C. G. Kurland, Molec. Gen. Genet., v. 115, 234 (1972). ⁹ C. G. Kurland, P. Voynow et al., Cold Spring Harb. Symb. Quant. Biol., v. 24, 17 (1969). ¹⁰ Ю. П. Семенов, С. В. Кириллов и др., Молекулярная биология, т. 5, 735 (1971). ¹¹ I. Gillam, G. Tener, In: Methods in Enzymology, v. 20, 55 (1971). ¹² W. E. Hill, G. P. Rosetti, J. Mol. Biol., v. 44, 263 (1969). ¹³ M. Nirenberg, P. Leder, Science, v. 145, 1399 (1964).