



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.962.32

УФ-ИНДУЦИРОВАННОЕ ОБРАЗОВАНИЕ КОВАЛЕНТНЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ФЕНИЛАЛАНИЛ-тРНК И БЕЛКАМИ 30S-СУБЧАСТИЦЫ РИБОСОМ *E. COLI*

Абдурашидова Г. Г., Турчинский М. Ф., Асланов Х. А.,
Будозский Э. И.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва;

Отдел биоорганической химии Академии наук Узбекской ССР, Ташкент

В процессе трансляции молекулы тРНК взаимодействуют с рядом белков рибосомальных субчастиц. Для белков 30S-субчастицы рибосом *E. coli* существование таких взаимодействий было показано несколькими методами [1—5], большинство из которых являются косвенными.

В настоящей работе мы применили для фиксации взаимодействий Phe-тРНК^{Phe} с белками 30S-субчастицы рибосом *E. coli* в составе тройного комплекса 30S·Phe-тРНК^{Phe}·poly(U) метод УФ-индуцированного образования РНК-белковых ковалентных связей [6]. Этот метод ранее был успешно использован для изучения контактов между нуклеиновыми кислотами и белками в ряде нуклеопротеидов [6], в том числе в рибосомах [7, 8].

30S-субчастицы рибосом *E. coli* [9], препараты [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} и Phe-[³³P]-тРНК^{Phe} [10] и тройной комплекс Phe-тРНК^{Phe}·30S·poly(U) [11] получали по описанным методам. Реакционные смеси, содержавшие тройной комплекс (200 мкл, 3—4 ОЕ₂₆₀ 30S-субчастиц), помещали на пленку Parafilm и облучали при 0° (λ 254 нм, интенсивность светового потока 0,84·10¹⁷ квант·мин⁻¹·см⁻²). Облученные и необлученные нуклеопротеиды разделяли добавлением додецилсульфата натрия и EDTA, затем центрифугированием в градиенте концентрации сахарозы [8] разделяли на две фракции: содержащую 16S-РНК и содержащую смесь Phe-тРНК^{Phe} с poly(U) и рибосомальные белки. При использовании препарата Phe-[³³P]-тРНК^{Phe} каждую фракцию концентрировали осаждением спиртом, подвергали гидролизу смесью рибонуклеаз А и Т₁ и гидролизаты разделяли двухмерным электрофорезом в полиакриламидном геле [8]. При этом белки, ковалентно связывающиеся с Phe-тРНК^{Phe}, могли быть идентифицированы, так как несут «пришитые» [³³P]-олигонуклеотиды (см. таблицу). При использовании [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} фракции, содержащие тРНК с ковалентно связанными белками, осаждали 66% уксусной кислотой [12], метили ¹²⁵I в условиях мечения белков [8], гидролизовали РНК и разделяли белки, как в случае Phe-[³³P]-тРНК. [¹²⁵I]-Меченые белки были идентифицированы автордиографией [8]. В контрольных экспериментах — необлученный тройной комплекс, облучение смесей без Phe-тРНК или без poly(U) — [¹²⁵I]-меченые белки обнаружены не были.

Белки 30S-субчастицы рибосом *E. coli*^{Phe} ковалентно связывающиеся с Phe-тРНК^{Phe} после облучения тройного комплекса 30S·Phe-тРНК^{Phe}·poly(U) в течение 60 мин *

Белки 30S-субчастицы	Относительная радиоактивность (% от общей) участков полиакриламидного геля, содержащих пришитые белки **		
	Phe-[³³ P]-тРНК ^{Phe}		[¹²⁵ I]Phe-тРНК ^{Phe} [¹²⁵ I]-меченые белки
	***	****	
S3+S4	28	18	10
S5	—	11	12
S6	—	9	7
S7	72	—	—
S8	—	3	9
S9+S11	—	19	11
S10	—	5	7
S13+S14	—	21	4
S15+S16+S17	—	8	16
S18	—	6	6
S19+S20	—	—	5

* Заметное количество белков пришивается к тРНК^{Phe} уже за 20 мин.

** Различия в относительном содержании для [³³P]- и [¹²⁵I]-содержащих белков связаны с неравномерностью вхождения иода в различные белки 181.

*** Фракция 16S-РНК из градиента концентрации сахарозы, содержащая белки, пришитые одновременно к тРНК и 16S-РНК.

**** Фракция тРНК^{Phe} из градиента концентрации сахарозы, содержащая белки, пришитые только к тРНК^{Phe}.

Участки полиакриламидных гелей, содержавшие [³³P]- или [¹²⁵I]-меченые белки, извлекали и определяли в них радиоактивность. Результаты представлены в таблице.

Пришивка белков, перечисленных в таблице, к Phe-тРНК^{Phe} указывает на существование соответствующих тРНК^{Phe}-белковых контактов в составе тройного комплекса 30S·Phe-тРНК^{Phe}·poly(U). Белки S7 и S4 и/или S3 эффективно сшиваются одновременно с 16S-РНК и Phe-тРНК^{Phe}. При этом набор белков, пришивающихся к Phe-тРНК^{Phe} в использованных нами условиях, содержит практически те же белки из 30S-субчастиц, для которых взаимодействие с тРНК было показано другими методами [1—5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Shimizu M., Craven G. R. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **61**, 307—315.
2. Lelong J. C., Gros D., Gros F., Bollen A., Maschler R., Stoffler G. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 248—252.
3. Ustav M., Villems R., Lind A. (1976) EMBO workshop on ribosomes, Bruxelles, August 1976.
4. Barrell H. R., Horowitz J. (1977) *Eur. J. Biochem.*, **75**, 533—544.
5. Гиринович А. С., Бочкарева Е. С., Овчинников Ю. А. (1976) *Биоорганическая химия*, **2**, 1073—1079.
6. Schimmel P. R., Budzik G. P., Lam S. M., Schoemaker H. J. P. (1976) in *Aging, Carcinogenesis and Radiation Biology* (Smith K. C., ed.), pp. 123—145.
7. Gorelic L. (1975) *Biochemistry*, **14**, 4622—4633.
8. Турчинский М. Ф., Броуде Н. Е., Кусова К. С., Абдурашидова Г. Г., Будовский Э. И. (1977) *Биоорганическая химия*, **3**, 1013—2020.
9. Bikenberry V. F., Bickle T. A., Traut R. R., Price C. A. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **12**, 113—116.
10. Gillam I. C., Tener G. M. (1971) in *Methods in Enzymology* (Moldave K., ed.), **20**, 381—391.
11. Семенов Ю. П., Махно В. И., Кириллов С. В. (1976) *Молекулярная биология*, **10**, 754—763.
12. Hardy S. J. S., Kurland C. G., Voynow P., Mora G. (1969) *Biochemistry*, **8**, 2897—2905.

Поступило в редакцию
19.VII.1977

UV INDUCED FORMATION OF THE COVALENT BONDS BETWEEN
Phe-tRNA^{Phe} AND THE PROTEINS OF THE *E. COLI* 30S SUBUNIT

ABDURASHIDOVA G. G., TURCHINSKY, M. F., ASLANOV Kh. A.,
BUDOVSKY E. I.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
Department of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the UzSSR, Tashkent*

UV-irradiation of ternary complex 30S·Phe-tRNA^{Phe}·poly(U) was shown to give rise to cross-linking between Phe-tRNA^{Phe} and a number of ribosomal proteins, such as S3 and/or S4, S5, S6, S9 and/or S11, S13, and/or S14, S15 and/or S16, S17. The proteins S7 as well as S3 and/or S4 are attached simultaneously to Phe-tRNA^{Phe} and 16S-RNA. The cross-linked ribosomal proteins containing [¹²⁵I]- or [³³P]-labels were identified by means of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.

•