



УДК 547.962.04

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РИБОСОМНОГО БЕЛКА S1
С 30S СУБЪЕДИНИЦЕЙ РИБОСОМ *E. COLI*

Бони И. В., Златкин И. В., Будовский Э. И.

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

УФ-облучение (λ 254 нм) 30S субъединиц рибосом *E. coli*, содержащих ^3H - или ^{125}I -меченый белок S1, не вызывает образования ковалентных сшивок между белком S1 и 16S рРНК. В то же время при облучении комплексов белка S1 с poly(U) или с изолированным 3'-концевым фрагментом 16S рРНК происходит эффективное ковалентное сшивание. Избыток олигодезоксинуклеотидов в инкубационной смеси не ингибирует связывание S1 с 30S субъединицей. Следовательно, S1 взаимодействует с 30S субъединицей за счет белок-белковых контактов.

Белок S1 из рибосом *E. coli* необходим для образования инициаторных комплексов с природными мРНК и трансляции бактериальных и фаговых матриц [1–7]. Способность свободного белка S1 к связыванию с различными природными и синтетическими полинуклеотидами [8–11] и его разрушающее воздействие на их вторичную структуру [12–14] заставляют предполагать, что именно эти свойства обуславливают роль белка S1 в трансляции. Так, Ван Дейеном и др. [5] была выдвинута гипотеза об узнавании белком S1 некой специфической высшей структуры в мРНК, нарушение которой обеспечивает правильное расположение мРНК в инициаторном комплексе. Корреляция между способностью свободного белка S1 изменять высшую структуру РНК и его функцией как компонента 30S субъединицы, определяющего связывание с ней матрицы, продемонстрирована в работе Кюльб и др. [14]. С другой стороны, Дж. и А. Дальберги [15] предложили модель, в которой роль S1 сводится к взаимодействию с 3'-концевой последовательностью 16S рРНК (...A-U-C-A-C-C-U-C-C-U-U-A_{OH}), что, по мнению авторов, необходимо для РНК–РНК-взаимодействий этого участка с инициаторными областями мРНК, согласно Шайн и Дальгарно [16]. О протрашественной близости этих двух компонентов мРНК-связывающего центра 30S субъединицы рибосом свидетельствуют и данные по пришиванию белка S1 к 3'-концу 16S рРНК при периодатном окислении 30S субъединиц [17, 18]. Идентификация в молекуле белка S1 двух полинуклеотидсвязывающих участков различной специфичности [19–21] позволила создать объединенную схему, по которой белок S1 одним своим участком взаимодействует с 3'-концевой областью 16S рРНК, а другой участок узнает и связывает матрицу [21]. Однако до сих пор прямые доказательства взаимодействия S1 с какой-либо областью 16S рРНК не представлены. Более того, последние данные Логреа и Мура [22] позволяют исключить предполагаемое взаимодействие этого белка с 3'-концевой последовательностью 16S рРНК, так как отсутствие этого

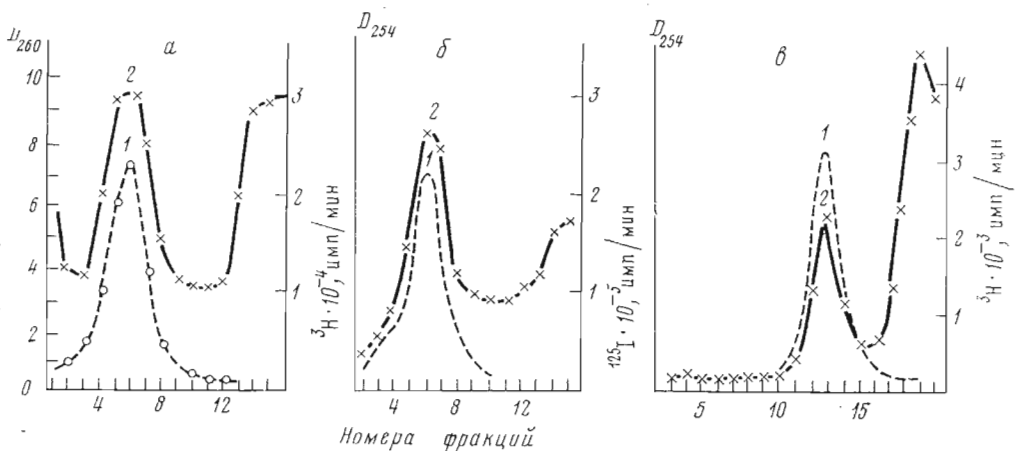


Рис. 1. Связывание ^3H - и ^{125}I -меченого белка S1 с 30S субчастицами рибосом *E. coli*: а — 10 ОЕ₂₆₀ «30S-S1»-субчастиц (750 пмоль), полученных по методу Тали и др. [1, 8], и 20 мкг (285 пмоль) [^3H]S1 ($\sim 6 \cdot 10^5$ имп/мин·мкг) в 0,25 мл буфера для связывания инкубировали 5 мин при 38° С и центрифугировали в 5–20% градиенте концентрации сахарозы на этом же буфере в роторе SW-50,1 (Beckman) 3 ч (43 000 об/мин, 4° С). Во фракциях измеряли D_{260} (1) и по 0,2 мл просчитывали в 5 мл сцинтиллятора Unisolve (2); б — 1,5 ОЕ₂₆₀ (113 пмоль) 30S субчастиц, дважды промытых 1 М NH_4Cl и 6 мкг (85 пмоль) [^3H]S1 ($7 \cdot 10^5$ имп/мин·мкг) в 100 мкл буфера для связывания, инкубировали и центрифугировали как описано выше и в опыте а; распределение оптической плотности получено с помощью регистрирующего спектрофотометра; в — 0,3 ОЕ₂₆₀ (23 пмоль) 30S субчастиц, полностью активных в образовании тройного комплекса с фенилаланил-тРНК и poly(U) [30], инкубировали 5 мин при 38° С с 6 мкг (85 пмоль) [^3H]S1 (15 000 имп/мин·мкг) в 100 мкл буфера для связывания. Центрифугирование в 10–30% сахарозном градиенте на этом же буфере аналогично описанному выше

фрагмента 16S рРНК не сказывается на способности активированных 30S субъединиц связывать S1. В связи с этим вопрос о существовании взаимодействий между белком S1 и 16S рРНК в составе 30S субъединиц остается открытым.

Методом, позволяющим зафиксировать непосредственные РНК-белковые контакты в природных нуклеопротеидах, в том числе в рибосомах (см., например, [23–25]), является индукция ковалентных полинуклеотид-белковых связей под действием УФ-облучения. В нашей лаборатории этот метод уже был применен для обнаружения контактов ряда сплит-белков с 16S рРНК в 30S субъединице [25], определения рибосомных белков, взаимодействующих с тРНК в А- и Р-сайтах рибосомы [26], анализа конформационных воздействий инициаторного фактора 3 (IF 3) на 30S субъединицу [27]. В данной работе метод УФ-индуцированных сшивок применили для выявления контактов между рибосомным белком S1 и 16S рРНК в 30S субъединице и между S1 и основаниями полинуклеотидной цепи в комплексах S1·poly(U) и S1·3'-концевой фрагмент 16S рРНК. Другой подход (использование рибосом, тотально меченных по белкам или РНК) неприемлем для изучения контактов белка S1 с 16S рРНК, так как пришитые белки идентифицируют с помощью электрофореза, при котором положение белка S1 совпадает с положением олигонуклеотид-белковых агрегатов.

Индивидуальный рибосомный белок S1 метили *in vitro* двумя независимыми способами: введением ^3H методом восстановительного оксиметилирования (модификация лизиновых остатков) [28] или вводили ^{125}I в условиях иодирования тирозиновых остатков белка [29].

Для селективного удаления белка S1 из 30S субчастиц обычно используют либо предварительную инкубацию субчастиц в 1 мМ трис-НСl [1, 8],

либо двукратную промывку 1 М NH_4Cl [7]. Как видно из рис. 1 и 2, ^3H - и ^{125}I -меченый белок S1 эффективно связывается с 30S субчастицами, предварительно лишеными этого белка. Белок S1 в растворе легко перераспределяется между субъединицами и обменивается со свободным белком [30]. Поэтому субчастицы, содержащие меченый белок S1, получали также добавлением этого белка к 30S субъединицам, содержащим полный набор белков (рис. 1в и 2) и полностью активным в образовании тройного комплекса с poly(U) и фенилаланил-тРНК^{Phe} [31].

Препараты 30S субчастиц, меченные по белку S1, облучали УФ-светом (λ 254 нм) и отделяли 16S рРНК с ковалентно пришитыми белками от непришитых белков в ранее описанных условиях [25]. Из рис. 3а, б видно, что содержание ^3H - или ^{125}I -радиоактивности в пике 16S рРНК в облученных препаратах достоверно не отличается от фона и не превышает 1% от общего содержания радиоактивности в испытуемом образце. Превышения этой величины не наблюдали в интервале доз 50–150 квант/нуклеотид (0,8–2,5 · 10⁵ квант/субчастица). Ранее было показано [25], что при таких дозах 30S субчастицы сохраняют свои физические и функциональные свойства и целостность 16S рРНК (рис. 3). В то же время степени пришивки некоторых других рибосомных белков к 16S рРНК или к тРНК [25, 26] при таких дозах уже довольно значительны.

На количестве связанной с 16S рРНК радиоактивности, обусловленной S1, не сказываются способы выделения и обработки 30S субчастиц и различие в методах мечения белка S1 *in vitro*. Отсюда следует, что практическое отсутствие ковалентных сшивок между S1 и 16S рРНК не является результатом каких-либо повреждений компонентов системы.

Как было показано Н. Е. Броуде и сотр. [27], присутствие инициаторного фактора 3 существенно изменяет РНК-белковые контакты в 30S субъединице, что выявляется с помощью метода УФ-индуцированных сшивок. Однако эти изменения не затрагивают белок S1, так как в присутствии IF3 УФ-облучение 30S субчастиц также не приводит к ковалентной сшивке между S1 и 16S рРНК.

Таким образом, в составе 30S субчастиц белок S1 либо не имеет контактов с 16S рРНК, либо эти контакты не чувствительны к УФ-облучению, т. е. не приводят к образованию УФ-индуцированных ковалентных связей.

В нуклеопротеидах под действием УФ-света (λ 254 нм) возбуждаются главным образом основания нуклеиновых кислот [32], поэтому взаимодействия белков с сахаро-фосфатным остовом РНК или ДНК могут и не фиксироваться при УФ-облучении. Связывание S1 с олигонуклеотидами по сахаро-фосфатному остову было продемонстрировано в работе [20]. В связи с этим нельзя исключить именно такой тип взаимодействия белка S1 с 16S рРНК в составе 30S субчастиц.

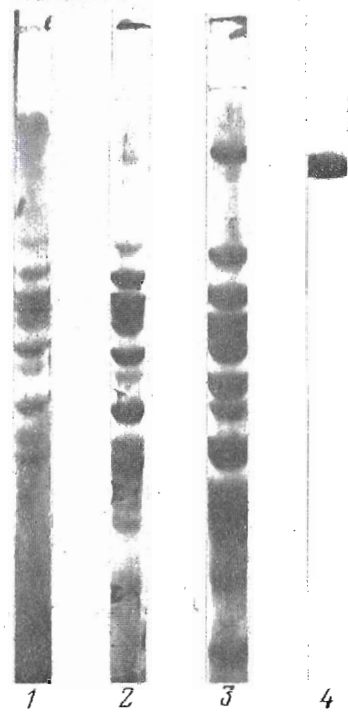


Рис. 2. Гель-электрофорез 30S субчастиц, полученных по методу Тая и др. [1, 8] (1), 30S субчастиц, дважды промытых 1 М NH_4Cl (2), исходных непромытых 30S субчастиц (3) и рибосомного белка S1 (4) в присутствии 4,5 М мочевины по Трауту [48]

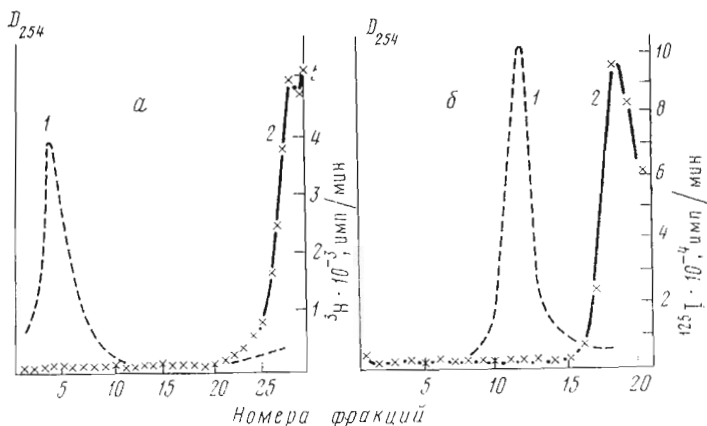


Рис. 3. Разделение компонентов 30S субчастиц в градиенте концентрации сахарозы (5–20% в буфере 25 мМ трис-HCl (pH 7,8), 0,1% додецилсульфат натрия, 10 мМ EDTA) после облучения: а – 3 ОЕ₂₆₀ 30S субчастиц, содержащих ³H-меченый S1 (80 000 имп/мин), облучали в 250 мкл буфера для связывания в течение 50 мин, добавляли додецилсульфат натрия и EDTA до 1% и 20 мМ соответственно. Центрифугирование в роторе SW-40, 35 000 об/мин, 17 ч, 4° С. Измерили распределение оптической плотности (1) и по 100 мкл каждой фракции просчитывали в 5 мл Unisolve (2); б – 2 ОЕ₂₆₀ 30S субчастиц, содержащих ¹²⁵I-меченый S1 (355 000 имп/мин), облучали в 100 мкл буфера для связывания в течение 30 мин, добавляли додецилсульфат натрия и EDTA и центрифугировали в роторе SW-40 (30 000 об/мин, 16 ч, 4° С)

Однако в этом случае можно было ожидать конкуренцию между 30S субчастицами и олигодезоксинуклеотидами в связывании с S1, так как известные константы ассоциации для этих комплексов сравнимы: $2-3,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ для S1·30S [31] и $4,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ для S1·d(pA)_n [20]. Тем не менее эксперимент показал, что присутствие 20-кратного молярного избытка олигодезоксинуклеотидов (dNp)_n (n7) в инкубационной смеси не влияет на эффективность связывания [¹²⁵I] S1 с 30S субчастицами (ср. рис. 1б и 4). Это свидетельствует о том, что для образования комплекса белка S1 с 30S субчастицами не требуется взаимодействие данного белка с сахаро-фосфатной частью 16S рРНК.

Отсутствие ковалентных сшивок между белком S1 и 16S рРНК при облучении 30S субчастиц ставит вопрос о том, может ли вообще взаимодействие белка S1 с полинуклеотидами быть зафиксировано этим методом. Мы изучили возможность образования УФ-индуцированных ковалентных сшивок при облучении комплексов S1 с poly(U) и с 3'-концевым фрагментом 16S рРНК, выделенным из рибосом, обработанных клоацином DF-13. Известно, что при действии на 70S рибосомы клоацином DF-13 производит разрыв цепи 16S рРНК на расстоянии 50 нуклеотидов от ее 3'-конца [33]. Используемый нами метод выделения 3'-концевого фрагмента (см. «Экспериментальную часть») привел к получению смеси олигонуклеотидов, содержащих этот фрагмент (рис. 5). В качестве контроля мы обрабатывали клоацином свободные 30S субчастицы, что по аналогии с действием колицина E3 на 30S субчастицу [34, 35] не должно приводить к расщеплению цепи 16S рРНК. Действительно, картина электрофореза в 15% полиакриламидном геле (рис. 5) в этом случае показывает отсутствие пика, соответствующего 50-членному фрагменту (clo-фрагменту).

Как видно из таблицы, белок S1 связывает на фильтре преимущественно clo-фрагмент, так как связывания контрольной фракции не наблюдается. Облучение (λ254 нм) смеси S1 с фракцией, содержащей clo-фраг-

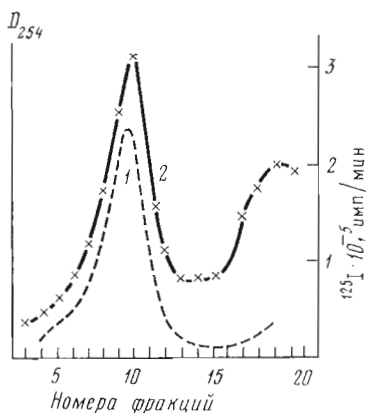


Рис. 4

Рис. 4. Связывание $[^{125}\text{I}]\text{S1}$ с 30S субчастицами в присутствии олигодезоксирибонуклеотидов ($n=7$). К 6 мкг (85 пмоль) $[^{125}\text{I}]\text{S1}$ в 25 мкл буфера для связывания добавляли 20 мкл (2600 пмоль, 0,2 ОЕ) раствора олигонуклеотидов в том же буфере, выдерживали 10 мин при 25°C и в смесь добавляли 1,5 ОЕ (113 пмоль) 30S субчастиц. Объем смеси доводили до 100 мкл, смесь инкубировали 5 мин при 38°C и анализировали в сахарозном градиенте как указано в подписи к рис. 16

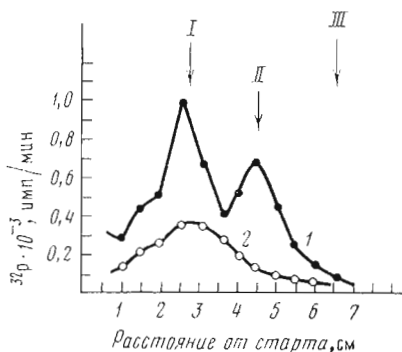


Рис. 5

Рис. 5. Гель-электрофорез в 15% полиакриламидном геле по Баап и др. [47] фракций олигонуклеотидов из 30S субчастиц, выделенных из $[^{32}\text{P}]\text{70S}$ рибосом, обработанных клоацином DF-13 (1), и из контрольных $[^{32}\text{P}]\text{30S}$ субчастиц, обработанных клоацином в тех же условиях, что и $[^{32}\text{P}]\text{70S}$ рибосомы (2). Олигонуклеотиды получены после отделения от высокомолекулярной РНК на целлюлозе DE-52. Римскими цифрами обозначено положение пика тРНК (I), положение пика, рассчитанное для 50-членного олигонуклеотида (II), и положение красителя бромфенолового синего (III). Для просчета радиоактивности гели разрезали по 0,5 см и радиоактивность просчитывали по Черенкову

мент, приводит к образованию ковалентного комплекса, который остается на мембранных фильтрах в условиях полного разрушения исходного комплекса (таблица). Образование комплекса с S1 и эффективное образование ковалентных сшивок при его облучении происходит также в случае $[^{125}\text{I}]\text{poly}(\text{U})$ (таблица).

Согласно данным Драпера и фон Хиппеля [21], во взаимодействие белка S1 с 3'-концевым фрагментом 16S рРНК и полирибониримидинами вовлечены нуклеиновые основания. Таким образом, полученные нами результаты показывают, что если белок S1 образует комплекс с полинуклеотидной цепью и в это взаимодействие вовлечены основания, то УФ-облучение таких комплексов приводит к эффективному образованию РНК-белковых ковалентных связей.

В связи с этим отсутствие ковалентных сшивок между белком S1 и 16S рРНК при облучении 30S субчастиц свидетельствует о том, что взаимодействий между этими компонентами нет. Отсюда следует, что участок белка S1, взаимодействующий с основаниями полинуклеотидной цепи, в связывание S1 с 30S субчастицей не вовлечен. Более того, данные о пришивании $\text{poly}(\text{U})$ к белку S1 при облучении тройного комплекса рибосома · $\text{poly}(\text{U})$ · Phe-тРНК [36] говорят о том, что этот участок S1 скорее всего служит для связывания с матрицей.

Важно подчеркнуть, что кардинальные различия по отношению к УФ-облучению между комплексами белка S1 с $\text{poly}(\text{U})$ или с 3'-концевым фрагментом 16S рРНК и комплексом S1 с 30S субъединицей рибосом выявляются в интервале доз облучения, которые не приводят к изменению физических и функциональных свойств субчастиц [25] и целостности 16S рРНК (рис. 3). В то же время в работе Горелика [37] имеются сведения

Образование УФ-индуцированных ковалентных сшивок между белком S1 и олигонуклеотидами *

³² P-радиоактивность (имп/мин над фоном), остающаяся на фильтрах				
Компоненты в смеси		Без облучения		После облучения (100 квант/нуклеотид) и разрушения
Нуклеотидный	Белковый	Без разрушения	После разрушения	
Контрольная фракция ^{2*}	—	30	15	—
	S1, 3·10 ⁻⁷ M	45	22	—
Фракция, содержащая clo-фрагмент ^{3*}	—	54	16	10
	S1, 3·10 ⁻⁷ M	410	95	272
[¹²⁵ I]poly(U) ^{4*}	—	252	20	42
	S1, 9·10 ⁻⁷ M	4470	53	1180

* В таблице приведены данные типичного опыта, усредненные из двух параллелей. Инкубационную смесь, содержащую белок S1 и соответствующий нуклеотидный компонент, выдерживали 10 мин при 0°С и фильтровали через миллипоровые фильтры Selectron BA-85 (см. «Экспериментальную часть»).

^{2*} Контрольная фракция из 30S субчастиц, обработанных клоацином DF-13 (см. рис. 5), 1400 имп/мин в пробе, концентрация нуклеотидов 1,3·10⁻⁷ M.

^{3*} Олигонуклеотидная фракция, содержащая clo-фрагмент (см. рис. 5), 9800 имп/мин в пробе, концентрация нуклеотидов 9·10⁻⁷ M.

^{4*} [¹²⁵I]poly(U), 6000 имп/мин в пробе, 3,6·10⁻⁶ M УМР.

о том, что S1 может пришиваться к 16S рРНК при высоких дозах облучения после длительного лаг-периода. Наличие лаг-периода указывает на то, что пришивка происходит не в составе исходного, нативного комплекса, а после определенных изменений, которые произошли в результате облучения (возможно, деградации РНК). Поэтому использование этих данных при выяснении природы контактов в нативном комплексе некорректно.

Результаты данной работы показывают, что ни один из двух охарактеризованных полинуклеотидсвязывающих участков S1 — ни участок, взаимодействующий по основаниям полинуклеотидной цепи [21], ни участок, связывающийся с ее сахаро-фосфатной частью [20], — не вовлечен во взаимодействие белка S1 с 30S субъединицей. Это ставит под сомнение ранее предполагавшееся существование взаимодействий между S1 и 16S рРНК в составе 30S субъединицы, хотя нельзя полностью исключить наличия высокоспецифического контакта, который не выявляется на модельных системах. Однако более вероятно, что образование комплекса S1 с 30S субчастицей происходит за счет взаимодействий S1 с рибосомными белками. Способность белка S1 к образованию чисто белок-белковых комплексов ярко подтверждается на примере Q_β репликазы, одной из четырех субъединиц которой он является [38]. Сходство требований к присутствию S1 в Q_β репликазе [39] и в 30S субчастице [5] для связывания мРНК уже отмечалось в литературе [5]. Весьма вероятно, что имеет место не только функциональная аналогия и, как и в случае Q_β репликазы, S1 связан с 30S субъединицей белок-белковыми взаимодействиями, а один или оба его полинуклеотидсвязывающих центра принимают участие в узнавании и связывании матрицы.

Экспериментальная часть

Непромытые 70S рибосомы из клеток *E. coli* MRE 600, выращенных до ранней логарифмической фазы, диализовали против стандартного буфера (10 mM трис-HCl (pH 7,7), 60 mM NH₄Cl, 0,1 mM дитиотреит) с 1 mM Mg²⁺ и 30S субъединицы выделяли зональным центрифугированием [40]. Для получения 30S субъединиц, лишенных белка S1, применяли метод Таля и др. [8] или двукратную промывку 1M NH₄Cl [7].

30S субъединицы, полностью активные в poly(U)-направленном связывании фенилаланил-tРНК, получены от С. В. Кириллова (Институт ядерной физики, Ленинград).

Очищенный клоацин DF-13 в комплексе с ингибитором — дар д-ра Ф. К. Де Граафа (Свободный университет, Амстердам, Нидерланды). Перед использованием препарат активировали прогреванием в течение 20 мин на кипящей водяной бане [41].

[^{125}I]poly(U) получена А. Р. Хомутовым в нашей лаборатории по методу [42]. Фракция олигодезоксирибонуклеотидов общей формулы $d(\text{pN})_7$, полученная из ДНКазного гидролизата ДНК *E. coli*, предоставлена Н. В. Чичковой (МГУ).

Белок S1 получали из непромытых 30S субчастиц по методу Талья и др. [8] с модификациями [1]. Белок дополнительно очищали с помощью хроматографии на целлюлозе DE-52 (Whatman); в градиенте 0,1–0,5M NH_4Cl в 10 mM трис-HCl, pH 8,0, пик белка выходит при 0,23M NH_4Cl . Концентрирование раствора белка проводили на колонке с целлюлозой DE-52 (0,5×1 см), элюируя по каплям 1M NH_4Cl в 10 mM трис-HCl, pH 8,0. Полученные препараты белка гомогенны при электрофорезе в полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия [43]. Концентрацию растворов белка определяли по методу Лоури [44].

Иодирование белка S1 проводили по методу Болла и др. [29] с некоторыми модификациями. Раствор I_2 (0,02 M), приготовленный согласно [29], перед процедурой мечения разводили в 10 раз 10 mM трис-основанием. К 6 мкл этого раствора добавляли 6 мкл щелочного раствора Na^{125}I без носителя (Amersham, 580 мКи/мл) и через 2 мин эту смесь вносили в 150 мкл раствора белка S1 в 1M NH_4Cl (300 мкг/мл). Всю операцию проводили при 0° С. Через 2 мин реакцию останавливали добавляя 5 мкл 2-меркаптоэтанола. Раствор белка освобождали от несвязанного иода диализом против стандартного буфера с 10 mM Mg^{2+} (буфер для связывания). Включение ^{125}I — около $7 \cdot 10^5$ имп/мин на 1 мкг белка.

Белок S1 метили тритием восстановительным оксиметилированием в описанных условиях [28], используя 0,14 M раствор боргритида натрия («Изотоп», СССР, 447 мКи/ммоль) в 0,01M NaOH.

После мечения раствор белка отделяли от несвязанной метки исчерпывающим диализом против буфера для связывания. Включение ^3H в белок — до $6 \cdot 10^5$ имп/мин/мкг белка.

Связывание ^{125}I - и ^3H -меченого S1 с 30S субчастицами. Перед работой препараты 30S субчастиц активировали прогреванием при 20 mM Mg^{2+} (38° С, 20 мин) согласно [45] и переводили в буфер для связывания; 1–10 ОЕ 30S субчастиц инкубировали с 5–40 мкг белка S1 в буфере для связывания (5 мин, 38° С) и несвязавшийся белок отделяли центрифугированием в градиенте концентрации сахарозы (см. рис. 1). Градиенты анализировали, используя проточный спектрофотометр UVD 254, VD ČSAV (ЧССР), ^3H -радиоактивность во фракциях измеряли в сцинтилляторе Unisolve 1 (Koch-Light), в спектрометре SL 30 (Intertechnique, Франция); ^{125}I -радиоактивность — в CG-30 гамма-спектрометре той же фирмы. 30S субчастицы осаждали 0,7 объемами 96% этанола и хранили при –20° С.

УФ-облучение и анализ облученных препаратов. Раствор 30S субчастиц (0,2 мл, 1–2 ОЕ₂₆₀), содержащих ^{125}I - или ^3H -меченый S1, помещали в открытые стеклянные стаканчики (диаметр 1–1,5 см) и облучали сверху при 0° С с перемешиванием полным светом ртутной лампы низкого давления БУВ-15 (интенсивность падающего светового потока I $2,5 \cdot 10^{17}$ квант/см²мин). К облученному и контрольному (необлученному) образцам добавляли 10% додецилсульфат натрия и 0,1M EDTA до конечной концентрации 1% и 0,02M соответственно и образцы анализировали в 5–20% сахарозном градиенте, содержащем 0,1% додецилсульфат натрия и 10 mM EDTA согласно [25].

Выделение фракции, содержащей 3'-концевой фрагмент 16S рРНК, из [³²P]рибосом *E. coli*. Выделение непромытых 70S рибосом из клеток *E. coli* MRE 600, выращенных на [³²PO₄]³⁻, проводили согласно [46]. 70S рибосомы (2 · 10⁷ имп/мин/ОЕ₂₆₀) в стандартном буфере с 10 мМ Mg²⁺ обрабатывали активированным клоацином DF-13 (0,02 мкг/1 ОЕ₂₆₀) 45 мин при 38° С [47]. Обработанные клоацином и контрольные рибосомы диализовали против стандартного буфера с 1 мМ Mg²⁺ и субчастицы разделяли центрифугированием в сахарозном градиенте при 4° С, 18 ч, 23 000 об/мин в роторе SW-27 (Beckman); 30S субчастицы осаждали при 10 мМ Mg²⁺ двумя объемами холодного этанола [47]. Депротенизацию проводили как описано в работе Баан и др. [47]. Осадок РНК после последнего осаждения растворяли в 10 мМ трис-НСl (рН 7,5), 100 мМ NH₄Cl и низкомолекулярные фрагменты отделяли на колонке с целлюлозой DE-52 (0,5 × 2 см), элюируя линейным градиентом 0,1–1М NH₄Cl (60 мл) в 10 мМ трис-НСl, рН 7,5. Радиоактивность во фракциях измеряли по Черенкову. Фракции низкомолекулярных фрагментов анализировали в 15% полиакриламидном геле по [47].

Эксперименты по связыванию на фильтрах. Облучение комплексов. Инкубационную смесь, содержащую немеченый белок S1 и соответствующий нуклеотидный компонент (как указано в таблице), выдерживали при 0° С 10–20 мин и по 100 мкл смеси фильтровали через миллипоровые фильтры Selectron BA 85 (0,45 мкм). Фильтры затем промывали 5 мл холодного буфера для связывания, высушивали и просчитывали в толуольном сцинтиляторе (4 г РРО – 200 мг РОРОР – 1 л толуола).

Для разрушения комплексов в инкубационную смесь добавляли равный объем раствора, содержащего 6М мочевины, 2% додецилсульфат натрия, 20мМ EDTA, 20 мМ трис-НСl, рН 7,4. Облучение комплексов проводили как указано выше для 30S субчастиц.

Авторы искренне благодарят А. Д. Пивазяна за выделение ³²P-меченых рибосом и Н. Е. Броуде и Н. И. Медведеву за предоставление инициаторного фактора 3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Van Duin J., Van Knippenberg P. H. (1974) *J. Mol. Biol.*, **84**, 185–195.
2. Szer W., Leffler S. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 3611–3615.
3. Szer W., Hermoso J. M., Leffler S. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 2325–2329.
4. Van Dieijen G., Van der Laken C. J., Van Knippenberg P. H., Van Duin J. (1975) *J. Mol. Biol.*, **93**, 351–366.
5. Van Dieijen G., Van Knippenberg P. H., Van Duin J. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **64**, 511–518.
6. Van Dieijen G., Van Knippenberg P. H., Van Duin J., Koekman B., Pouwels P. H. (1977) *Mol. Gen. Genet.*, **153**, 75–80.
7. Sobura J. E., Chowdhury M. R., Hawly D. A., Wahba A. J. (1977) *Nucleic Acids Res.*, **4**, 17–29.
8. Tal M., Aviram M., Kanarek A., Weiss A. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **281**, 381–392.
9. Carmichael C. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 6160–6167.
10. Krol A., Branlant C., Ebel J.-P., Visentin L. P. (1977) *FEBS Lett.*, **80**, 381–392.
11. Senear A. W., Steitz J. A. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 1902–1912.
12. Bear D. G., Ray N., Van Derveer D., Johnson N. P., Thomas G., Schleich T., Noller H. F. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 1824–1828.
13. Szer W., Hermoso J. M., Boublik M. (1976) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **70**, 957–964.
14. Kolb A., Hermoso J. M., Thomas J. O., Szer W. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 957–964.
15. Dahlberg A. E., Dahlberg J. E. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 2940–2944.
16. Shine J., Dalgarno L. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 1342–1346.
17. Kenner R. A. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **51**, 932–938.
18. Czernilovsky A. P., Kurland C. G., Stöffler G. (1975) *FEBS Lett.*, **58**, 281–284.
19. Draper D. E., Pratt C. W., von Hippel P. H. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 4786–4790.
20. Draper D. E., von Hippel P. H. (1978) *J. Mol. Biol.*, **122**, 321–338.
21. Draper D. E., von Hippel P. H. (1978) *J. Mol. Biol.*, **122**, 339–358.

22. Laughrea M., Moore P. B. (1978) *J. Mol. Biol.*, **121**, 411-430.
23. Gorelic L. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **390**, 209-225.
24. Möller K., Brimacombe R. (1975) *Mol. Gen. Genet.*, **141**, 343-355.
25. Turchinsky M. F., Broude N. E., Kussova K. S., Abdurashidova G. G., Muchamedganova E. V., Schatsky I. N., Bystrova T. F., Budowsky E. I. (1978) *Eur. J. Biochem.*, **90**, 83-88.
26. Абдурашидова Г. Г., Турчинский М. Ф., Салихов Т. А., Асланов Х. А., Будовский Э. И. (1978) *Биоорганическая химия*, **4**, 982-983.
27. Брууде Н. Е., Кусова К. С., Медведева Н. И., Будовский Э. И. (1978) *Биоорганическая химия*, **4**, 1687-1689.
28. Reboud A.-M., Buisson M., Arpin M., Reboud J.-P. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, **474**, 578-588.
29. Ball W. F., Helmkamp R. W., Davis T. P., Izzo M. J., Goodland R. Z., Contreras M. A., Spar Y. Z. (1966) *Proc. Soc. Exptl Biol. and Med.*, **122**, 407-414.
30. Семенов Ю. П., Махно В. И., Кириллов С. В. (1976) *Молекулярная биология*, **10**, 754-763.
31. Laughrea M., Moore P. B. (1977) *J. Mol. Biol.*, **112**, 399-421.
32. Budowsky E. I., Simukova N. A., Turchinsky M. F., Boni I. V., Skoblov Yu. S. (1976) *Nucleic Acids Res.*, **3**, 261-276.
33. De Graaf F. K., Niekus H. G. D., Klootwijk J. (1973) *FEBS Lett.*, **35**, 161-164.
34. Boon T. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 549-552.
35. Bowman C. M. (1972) *FEBS Lett.*, **22**, 73-75.
36. Margaritella P., Kuechler E. (1978) *FEBS Lett.*, **88**, 131-134.
37. Gorelic L. (1975) *Biochemistry*, **14**, 4627-4633.
38. Wahba A. J., Miller M. J., Niveleau A., Landers T. A., Carmichael G. G., Weber K., Hawley D. A., Slobin L. I. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 3314-3316.
39. Kamen R., Kondo M., Römer W., Weissmann C. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **31**, 44-51.
40. Eikenberry E. F., Bickle T. A., Traut R. R., Price C. A. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **12**, 113-116.
41. Oudega B., Meckel C. J. A. M., De Graaf F. K. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **399**, 213-216.
42. Dale R. M. K., Ward D. C., Livingstone D. C., Martin E. (1975) *Nucleic Acids Res.*, **2**, 915-930.
43. Weber K., Osborn M. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412.
44. Lowry O., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
45. Zamir A., Miskin R., Elson D. (1971) *J. Mol. Biol.*, **60**, 347-364.
46. Fellner P. (1969) *Eur. J. Biochem.*, **11**, 12-27.
47. Baan R. A., Van Charldorp R., Van Leerdam E., Van Knippenberg P. H., Bosch L., De Rooij J. F. M., Van Boom J. H. (1976) *FEBS Lett.*, **71**, 351-355.
48. Traut R. R. (1966) *J. Mol. Biol.*, **21**, 571-576.

Поступила в редакцию
9.II.1979

После переработки
24.V.1979

RIBOSOMAL PROTEIN S1 INTERACTION WITH THE 30S SUBUNIT OF *E. COLI* RIBOSOME

BONI I. V., ZLATKIN I. V., BUDOWSKY E. I.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

UV-irradiation (λ 254 nm) of 30S ribosomal subunits containing [^3H] or [^{125}I]labeled protein S1 does not result in the covalent crosslinking of 16S RNA to S1. On the other hand, UV-irradiation of S1 complexes with poly(U) or with 3'-terminal fragment of 16S RNA produces covalent crosslinking. The assembly of the ribosomal protein S1 with 30S subunit is not inhibited by the excess of oligodeoxynucleotides. Hence, the association of the protein S1 with 30S subunit of *E. coli* ribosome is determined by protein-protein interactions.