

4. Масколюнас Р. К., Лекис А. В., Коваленко М. И. Биосинтез белка в бесклеточных белоксинтезирующих системах из миокарда кролика при тотальной ишемии // Биополимеры и клетка.— 1989.—5, № 1.— С. 84—86.
5. Масколюнас Р. К. Структурно-функциональные изменения в пуле рибосом миокардиальных клеток кроликов при тотальной ишемии // Сб. науч. тр. 1-ой респ. конф. молодых ученых медиков ЛитССР.— Каунас, 1988.— С. 54—57.
6. Morphological and biochemical changes in autolyzing dog heart muscle / L. C. Armitage, R. N. Seelye, V. M. Carnell et al. // Lab. Invest.— 1976.—34, N 4.— P. 357—362.
7. Явич М. П., Лерман М. И. Бесклеточная система белкового синтеза из сердечной мышцы кролика // Вопр. мед. химии.— 1976.— № 3.— С. 307—327.
8. Берман А. Е. Метод выделения полирибосом, свободных и связанных с мембранами цитоплазматической сети // Современ. методы в биохимии.— М.: Медицина, 1977.— С. 300—303.
9. Изучение молекулярных механизмов гипоальбуминемии на модели экспериментального инфаркта миокарда / А. В. Лекис, Л. Ю. Лукошвичюс, М. И. Коваленко, О. В. Буддакова // Биополимеры и клетка.— 1985.—1, № 6.— С. 322—327.
10. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.— 1970.—227, N 5259.— P. 680—685.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики  
АН УССР, Киев

Получено 20.03.89

#### ELECTROPHORETICAL ANALYSIS OF TRANSLATION PRODUCTS IN THE CELL-FREE SYSTEMS FROM NORMAL AND ISCHEMIC RABBIT MYOCARDIUM

R. K. Maskoliunas

Institute of Molecular Biology and Genetics, Academy of Sciences  
of the Ukrainian SSR, Kiev

#### Summary

The rate of radioactive amino acid incorporation into translational product in the reconstructed protein-synthesizing cell-free systems, consisting of cytosol and polyribosomes from normal and ischemic myocardium is compared. The alteration in protein-synthesizing activity is shown to depend mainly on the properties of polyribosomal preparations. Electrophoretical analysis of the translational products with subsequent fluorography has revealed redistribution of some protein fractions in the system from ischemic myocardium.

УДК 577.112.088.3

А. Д. Яремчук, М. А. Тукало, А. В. Коноваленко,  
С. П. Егорова, Г. Х. Маука

#### ВЫДЕЛЕНИЕ СЕРИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЫ ИЗ THERMUS THERMOPHILUS HB-27

Описан метод выделения высокоочищенного препарата серил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus*. Использовали высаливание сульфатом аммония, хроматографию на ДЭАЭ-сефарозе, оксианатите, генарин-сефарозе и гидрофобную хроматографию на поливинилолом сорбенте Toyopearl HW-65. Выход очищенного фермента составил 4 мг из 1 кг клеток *T. thermophilus*. Серил-тРНК синтетаза является димером  $\alpha_2$ -типа. Молекулярная масса фермента 90000.

Аминоацил-тРНК синтетазы и тРНК являются уникальными объектами для изучения молекулярных механизмов белково-нуклеинового взаимодействия. В настоящее время достигнуты определенные успехи в исследовании структуры тРНК — аминоацил-тРНК синтетазного комплекса [1]. Однако подобные работы проводились с тРНК первого класса, имеющими короткую переменную петлю. Экспериментальные же данные по изучению взаимодействия аминоацил-тРНК синтетаз с тРНК второго класса (с длинной переменной петлей) крайне ограничены.

Важнейшим этапом на пути к пониманию механизма специфического взаимодействия тРНК и аминоксил-тРНК синтетаз являются структурные исследования этих макромолекул.

В данном сообщении описан метод выделения высокоочищенного препарата серил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus* HB-27. тРНК указанной специфичности относится ко второму классу, а аминоксил-тРНК синтетазы из этого объекта обладают высокой термостабильностью, что позволяет использовать физические методы при изучении структуры этих ферментов.

Пострибосомный супернатант *T. thermophilus* любезно предоставлен М. Б. Гарбер (Ин-т белка АН СССР). Суммарный препарат тРНК *Escherichia coli* получен из ВНИИ прикл. биохимии (Олайне, ЛатвССР). Серил-тРНК синтетазную активность определяли по начальной скорости образования аминоксил-тРНК. Инкубационная смесь в 0,05 мл содержала 100 мМ трис-НСI-буфер, рН 8,0, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ АТР, 10 мМ КСI, 0,3 мМ <sup>14</sup>С-серин, 5 мг/мл суммарного препарата тРНК *E. coli*, 0,2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА) и от 0,05 до 10 мкг белка (в зависимости от степени очистки фермента). Смесь инкубировали в течение 30 с при 55 °С. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл охлажденной 10 %-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Образовавшиеся осадки отмывали на миллиметровых фильтрах 50 мл 5 %-ной ТХУ. Радиоактивность проб определяли на спинтillationном счетчике SL-30 фирмы «Intertechnique» (Франция). Молекулярную массу серил-тРНК синтетазы устанавливали методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в нативных условиях при разных концентрациях геля [2], молекулярную массу субъединиц — с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии DS-Na. За единицу активности серил-тРНК синтетазы принимали количество фермента, катализирующее аминокислотирование 1 нмоль тРНК<sup>Ser</sup> за 1 мин при 55 °С.

В таблице представлены данные, характеризующие степень очистки серил-тРНК синтетазы на каждой стадии выделения. На первой стадии очистки использовали высаливание пострибосомного супернатанта сульфатом аммония (45 % насыщения). Полученный осадок диализовали против 50 мМ трис-НСI-буфера, рН 7,8), содержащего 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 0,1 мМ азид натрия, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) (буфер А) и наносили на колонку (5×50 см) с ДЭАЭ-сефарозой («Pharmacia», Швеция), уравновешенной буфером А. Элюцию проводили в этом же буфере в градиенте концентрации NaCl от 0,03 до 0,3 М (объем градиента 2,5 л). Фракцию с ДЭАЭ-сефарозы, обладающую серил-тРНК синтетазной активностью, высаливали сульфатом аммония (45 % насыщения) и хроматографировали на колонке (2,5×60 см) с поливиниловым сорбентом Toyopearl HW-65 («Toyo Soda», Япония) в буфере А в обратном градиенте концентрации сульфата аммония от 40 до 10 % насыщения (объем гради-

*Очистка серил-тРНК синтетазы T. thermophilus HB-27*

*Purification of seryl-tRNA synthetase from T. thermophilus HB-27*

Основные стадии очистки	Общий белок, мг	Общая активность, ед. акт.	Удельная активность, ед. акт./мг	Степень очистки	Выход, %
Высаливание пострибосомного супернатанта сульфатом аммония, 45 % насыщения	23690	18952	0,8	1,0	100
Хроматография на ДЭАЭ-сефарозе	2936	19378	6,6	8,3	102
Гидрофобная хроматография на Toyopearl HW-65	740	9324	12,6	15,7	40
Хроматография на оксиапатите	218	7521	34,5	43,1	40
Рехроматография на Toyopearl HW-65	77	7423	96,4	120,5	39
Хроматография на гепарин-сефарозе	4	6004	1501	1876	32

ента 1,8 л). Фракцию, содержащую серил-тРНК синтетазу, диализовали в течение 20 ч против 10 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7,8, содержащего 5 мМ β-меркаптоэтанол, 0,1 мМ азид натрия, 0,1 мМ ФМСФ (буфер Б) и наносили на колонку (2,5×55 см) с оксиапатитом («Bio-Rad», США), уравновешенным этим же буфером. Фермент элюировали в градиенте концентрации калий-фосфатного буфера от 0,01

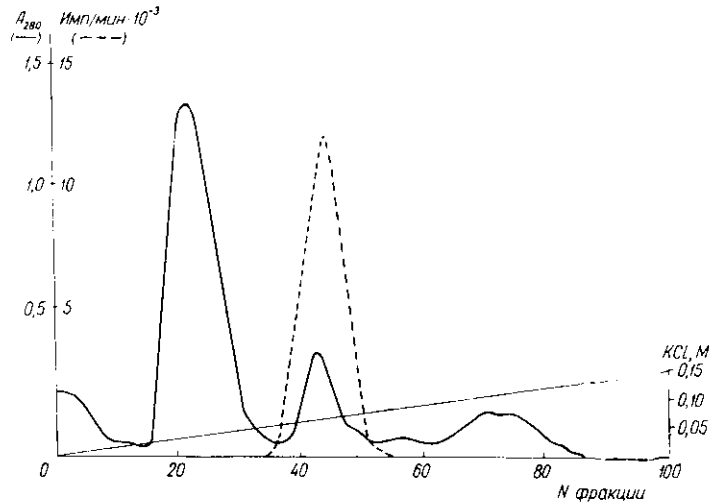


Рис. 1. Хроматография серил-тРНК синтетазы *T. thermophilus* на гепарин-сефарозе  
Fig. 1. Chromatography of seryl-tRNA synthetase from *T. thermophilus* on heparin-sepharose

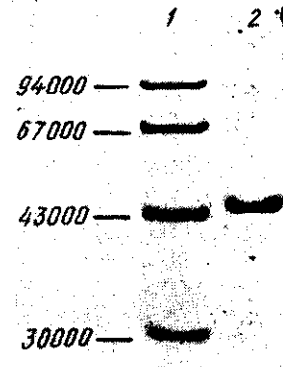


Рис. 2. Электрофорез в ПААГ в присутствии DS-Na: 1 — смесь стандартных белков; 2 — серил-тРНК синтетазы *T. thermophilus* после хроматографии на гепарин-сефарозе  
Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate: 1 — molecular mass markers; 2 — seryl-tRNA synthetase of *T. thermophilus* after chromatography on heparin-sepharose column

до 0,2 М (объем градиента 3 л). Серил-тРНК синтетазу высаливали сульфатом аммония и проводили рехроматографию на Toyopearl HW-65 в тех же условиях, что и первичную хроматографию. Окончательная очистка серил-тРНК синтетазы была осуществлена на гепарин-сефарозе (рис. 1). Белок после диализа хроматографировали на колонке (0,5×15 см) с гепарин-сефарозой («Pharmacia», Швеция), уравновешенной буфером А, в градиенте концентрации КСl от 0 до 0,25 М (объем градиента 0,5 л).

Таким образом, из 1 кг бактериальной массы получено 4 мг препарата серил-тРНК синтетазы — практически в индивидуальном состоянии, судя по данным электрофореза (рис. 2). О высокой степени чистоты полученного препарата фермента свидетельствуют также данные об отсутствии примесей других аминоксил-тРНК синтетаз, содержание которых определяли, используя смесь <sup>14</sup>С-аминокислот гидролизата хлореллы и избыток <sup>12</sup>С-серина.

Изучена также температурная зависимость скорости реакции аминокислотирования, катализируемой серил-тРНК синтетазой *T. thermophilus*. Установлено, что температурный оптимум находится в области

70 °С. Значение удельной активности полученного препарата серил-тРНК синтетазы при оптимальных условиях реакции аминоацилирования и при использовании в качестве субстрата гомологичной тРНК из *T. thermophilus* составляет 2552 ед/мг. Молекулярная масса фермента по данным электрофореза в ПААГ в нативных условиях — 90 000. Серил-тРНК синтетаза представляет собой структурный димер, состоящий из двух идентичных субъединиц с молекулярными массами 46 000 (рис. 2). Аналогичная олигомерная структура и близкие молекулярные массы показаны для серил-тРНК синтетаз из других прокариотических объектов [4, 5].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Киселев Л. Л., Фаворова О. О., Лаврик О. И. Биосинтез белка от аминокислот до аминоацил-тРНК.— М.: Наука, 1984.—480 с.
2. Hedrick J. L., Smith A. J. Estimation of molecular weight by polyacrylamide gel electrophoresis // Arch. Biochem. and Biophys.—1968.—126, N 1.—P. 155—164.
3. Weber K., Osborn M. The reability of molecular weight by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis // J. Biol. Chem.—1969.—244, N 16.—P. 4406—4412.
4. Katze J. R., Konigsberg W. Purification and properties of seryl transfer ribonucleic acid synthetase from *Escherichia coli* // Ibid.—1970.—245, N 5.—P. 923—930.
5. Samuelsson T., Lundvik L. Purification and some properties of asparagine, serine and valine: tRNA ligases from *Bacillus stearothermophilus* // Ibid.—1978.—253, N 10.—P. 7033—7039.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики  
АН УССР, Киев

Получено 10.03.89

#### ISOLATION OF SERYL-tRNA SYNTHETASE FROM *THERMUS THERMOPHILUS* HB-27

A. D. Yaremchuk, M. A. Tukalo, A. V. Konovalenko, S. P. Egorova,  
G. Kh. Matsuka

Institute of Molecular Biology and Genetics Academy  
of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

#### Summary

A method to isolate seryl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* is described. It includes ammonium sulfate fractionation, chromatography on DEAE-sepharose, hydroxyapatite, heparine-sepharose and hydrophobic chromatography on polyvinyl sorbent Toyopearl HW-65. The yield of highly purified enzyme was 4 mg from 1 kg of *T. thermophilus* cells. Seryl-tRNA synthetase is a dimer protein ( $\alpha_2$  type) with molecular mass of 90 kDa.