

8. Buckingham R. H., Kurland C. G. Interaction between UGA-suppressor tRNA^{Trp} and the ribosome; mechanisms of tRNA selection // Transfer RNA: Biol. Aspects.— New York: Cold Spring Harbor, 1980.— P. 421—426.
9. Морозов И. А., Гамбарян А. С., Венкстерн Т. В. тРНК(аденин-1)-метилтрансфераза из *Thermus thermophilus* // Молекуляр. биология.— 1984.— 18, № 5.— С. 1363—1368.
10. Kirillov S. V., Makhno V. I., Semenov Yu. P. Mechanism of codon-anticodon interaction in ribosomes. Direct functional evidence that isolated 30S subunits contain 2 codon-specific binding sites for tRNA // Nucl. Acids Res.— 1980.— 8, N 1.— P. 183—196.
11. Алкилирование тРНК^{Phe} 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензил-5'-фосфамидом d(ATTTTCA) / О. И. Гимаутдинова, В. В. Горн, И. И. Горшкова и др. // Биоорг. химия.— 1986.— 12, № 4.— С. 490—498.
12. Бабкина Г. Т., Карпова Г. Г., Матасова Н. Б. Аффинная модификация рибосом *Escherichia coli* вблизи акцепторного тРНК-связывающего участка // Молекуляр. биология.— 1984.— 18, № 5.— С. 1287—1296.
13. Взаимодействие района s⁴U₈ тРНК^{Phe} с тРНК(аденин-1)-метилтрансферазой из *Thermus thermophilus* / Т. В. Венкстерн, Д. М. Грайфер, Э. А. Грачева и др. // Биоорг. химия.— 1987.— 13, № 10.— С. 1344—1350.
14. Mechanism of codon-anticodon interactions in ribosomes. Codon-anticodon interaction of aminoacyl-tRNA at the ribosomal donor site / S. V. Kirillov, K. Sh. Kemkhadze, E. M. Makarov et al. // FEBS Lett.— 1980.— 120, N 2.— P. 221—224.
15. Douthwaite S., Garrett R. A., Wagner R. Comparison of *Escherichia coli* tRNA^{Phe} in the free state, in the ternary complex and in the ribosomal A and P sites by chemical probing // Eur. J. Biochem.— 1983.— 131, N 2.— P. 261—269.
16. Bertram S., Goring U., Wagner R. Structural investigation of Phe-tRNA^{Phe} from *Escherichia coli* bound to the ribosomal A site // Nucl. Acids Res.— 1983.— 11, N 3.— P. 575—585.
17. Peattie D. A., Herr W. Chemical probing of the tRNA-ribosome complex // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1981.— 78, N 4.— P. 2273—2277.
18. Purification and characterization of tRNA(Adenine-1)-methyltransferase from *Thermus thermophilus* strain 71 / I. A. Morozov, A. S. Gambaryan, T. N. Lvova et al. // Eur. J. Biochem.— 1982.— 129, N 2.— P. 429—439.
19. Использование флуоресценции триптофановых остатков тРНК(аденин-1)-метилтрансферазы для исследования структуры фермента и его комплексов с тРНК / О. Ф. Борисова, И. А. Морозов, Н. В. Кузнецова и др. // Молекуляр. биология.— 1986.— 20, № 4.— С. 1126—1137.

Ин-т биоорг. химии Сиб. отд-ния АН СССР, Новосибирск
Ин-т молекуляр. биологии АН СССР, Москва

Получено 28.08.89

УДК 577.963.3

© М. М. Юсупов, Т. Н. Спирина, 1990

ДОСТУПНОСТЬ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ ТРИПСИНУ В РИБОСОМАХ THERMUS THERMOPHILUS

Определены белки, доступные трипсину, в составе рибосом и рибосомных субчастиц из экстремального термофила *T. thermophilus*. В 70S рибосомах доступны трипсину 7 белков малой (30S) субчастицы — TS2, TS3, TS7, TS12, TS17, TS19, TS20 и 5 белков большой (50S) субчастицы — TL5, TL8, TL9, TL23, TL24. Диссоциация 70S рибосом на субчастицы не приводит к появлению дополнительных белков, доступных трипсину. Последнее подтверждает сделанный ранее вывод об отсутствии рибосомных белков между субчастицами.

Введение. Метод трипсинолиза был разработан для определения белков, экспонированных на поверхности рибосом *Escherichia coli*, и исследования изменений поверхности рибосом в процессе их функционирования [1]. Было показано, что трипсин обладает высокой чувствительностью к изменениям в структуре рибосом и в то же время не разрушает рибосому, модифицируя лишь часть белков, расположенных на поверхности.

Этот метод также был использован для сравнения доступности трипсину рибосомных белков в рибосомах и диссоциированных субчастицах. Белки, более доступные трипсину в диссоциированных рибосомных субчастицах, были отнесены к белкам, расположенным на контактирующих поверхностях субчастиц [2]. Однако диссоциация рибосомы

на субчастицы при понижении концентрации ионов магния в среде, как правило, приводит к изменениям в структуре рибосомных субчастиц [3]. Следовательно, наблюдаемые различия в доступности рибосомных белков в целой рибосоме и в отдельных субчастицах можно объяснить изменениями в структуре рибосомных субчастиц.

В настоящей работе использован метод трипсинолиза для сравнения экспонированности рибосомных белков в составе исходных рибосом и в составе диссоциированных рибосомных субчастиц из бактерий *T. thermophilus*. В этом случае ожидали, что ввиду большей стабильности рибосомной структуры по сравнению с мезофильными рибосомами диссоциация на субчастицы при понижении магния в среде не вызовет изменений в структуре субчастиц. Было показано, что диссоциация рибосом не приводит к экспонированию дополнительных белков на поверхности рибосомных субчастиц.

Материалы и методы. 70S *T. thermophilus* получали, как описано в работе [4]. Перед экспериментами по трипсинолизу рибосомы переводили в буфер, содержащий 20 мМ трис- HCl, pH 7,5, 20 мМ MgCl₂, 150 мМ NH₄Cl, 1 мМ дитиотреитол и для получения смеси рибосомных субчастиц концентрацию ионов магния снижали до 5 мМ. Диссоциацию рибосом на субчастицы контролировали по рассеянию света при 400 нм. Эксперименты по трипсинолизу проводили, как описано в работе [1], увеличив концентрацию трипсина в инкубационной смеси в 40 раз. К рибосомам в соответствующем буфере добавляли трипсин, растворенный в том же буфере в концентрации 1 мг/мл. Конечная концентрация рибосом в инкубационной смеси 5 мг/мл; объем инкубационной смеси — 100 мкл. Весовое соотношение рибосомы/трипсин было равно 50/1. Смесь инкубировали от 5 до 30 мин при 37 °С. Сохранность рибосомных РНК и рибосомных частиц контролировали методом аналитического ультрацентрифугирования. Реакцию останавливали добавлением двух объемов ледяной уксусной кислоты и далее белок экстрагировали по методу, описанному в работе [5]. Белок осаждали пятью объемами охлажденного ацетона и анализировали методом двухмерного электрофореза [6].

Результаты и обсуждение. Магниева зависимость диссоциации рибосом. Степень диссоциации рибосом в инкубационной смеси определяли по рассеянию света длиной волны 400 нм во флюориметре, параллельно контролируя состояние рибосом методом аналитического центрифугирования (рис. 1). Было показано, что при концентрации ионов магния в среде ниже 6 мМ наблюдается полная диссоциация рибосом на 30S и 50S субчастицы. При концентрации ионов магния выше 13 мМ наблюдаются только 70S рибосомы.

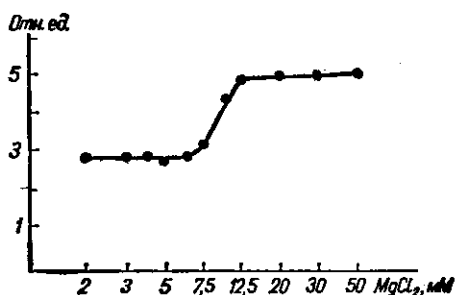


Рис. 1. Магниева зависимость диссоциации рибосом *T. thermophilus* по данным светорассеяния

Fig. 1. Dependence of *T. thermophilus* ribosome dissociation on Mg²⁺ concentration by light scattering data

Кинетика трипсинолиза рибосом *T. thermophilus*. В таблице приведены результаты кинетики трипсинолиза рибосом *T. thermophilus*. Видно, что даже при кратковременной инкубации рибосом с трипсином при 0 °С некоторые рибосомные белки (TS2, TS3, TS17, TS20 и TL5) частично модифицируются. Далее при инкубации от 5 до 15 мин при 37 °С картина трипсинолиза не меняется. Оказалось, что число белков, модифицирующихся в рибосомах *T. thermophilus*, несколько выше, чем в рибосомах *E. coli* [1]. Белки TS2, TS3, TS7, TS12, TS17, TS19, TS20, TL5, TL9 и TL23 модифицируются полностью, а белки TL8 и TL24 частично (таблица, рис. 2, б).

Трипсинолиз рибосом и рибосомных субчастиц *T. thermophilus*. На рис. 2, б, в, представлены результаты трипсиноли-

за рибосом и рибосомных субчастиц *T. thermophilus* соответственно. Видно, что диссоциация рибосом на субчастицы не приводит к появлению дополнительных белков, доступных трипсину. На основании этого результата можно сделать вывод, что структура рибосомных субчастиц в составе рибосом и после их диссоциации неизменна и на контактирующих поверхностях рибосомных субчастиц нет белков, доступных трипсину.

Известно, что рибосомы и рибосомные субчастицы экстремального термофильного микроорганизма *T. thermophilus* отличаются высокой

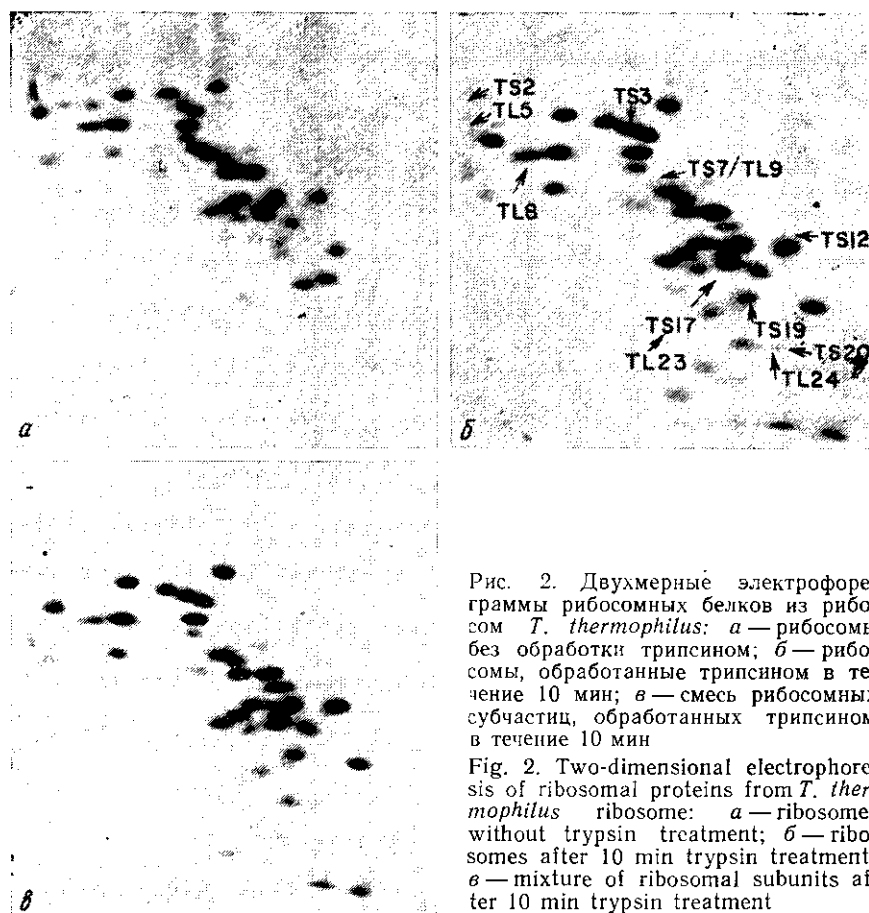


Рис. 2. Двухмерные электрофорезы рибосомных белков из рибосом *T. thermophilus*: а — рибосомы без обработки трипсином; б — рибосомы, обработанные трипсином в течение 10 мин; в — смесь рибосомных субчастиц, обработанных трипсином в течение 10 мин

Fig. 2. Two-dimensional electrophoresis of ribosomal proteins from *T. thermophilus* ribosome: а — ribosomes without trypsin treatment; б — ribosomes after 10 min trypsin treatment; в — mixture of ribosomal subunits after 10 min trypsin treatment

стабильностью. В частности, 30S рибосомные субчастицы не разворачиваются в нуклеопротеидные тяжи в среде без ионов магния и для экстракции рибосомных белков необходимы более высокие концентрации одновалентных катионов, чем в случае рибосом мезофильных бактерий (данные не приведены). По-видимому, именно высокая стабильность рибосом позволила получить в кристаллической форме 70S рибосомы и 30S субчастицы [7]. Рибосомные субчастицы в составе рибосом и в диссоциированном виде, очевидно, имеют одинаковую нативную структуру. Это предположение хорошо согласуется с результатами настоящей работы, где было показано, что рибосомные белки *T. thermophilus* одинаково доступны трипсину в составе рибосом и в составе рибосомных субчастиц.

На основании результатов исследования поверхности рибосомных субчастиц *E. coli* методом тритиевой бомбардировки был сделан вывод об отсутствии белков на контактирующих поверхностях рибосомных субчастиц [8]. Этот вывод также хорошо согласуется с выводом об отсутствии белков, доступных трипсину, на контактирующих поверхностях рибосомных субчастиц *T. thermophilus*.

Кинетика трипсинолиза рибосом
Trypsinolysis kinetics of T. thermophilus ribosomes

Белок	Время инкубации, мин				Белок	Время инкубации, мин			
	0	5	10	15		0	5	10	15
TS2	±	±	—	—	TL1	+	+	+	+
TS3	±	—	—	—	TL2	+	+	+	+
TS4	+	+	+	+	TL3	+	+	+	+
TL8/TS5	+	+	+	+	TL4	+	+	+	+
TS6	+	+	+	+	TL5	±	±	—	—
TL9/TS7	+	±	—	—	TL7	+	+	+	+
TS8	+	+	+	+	TL8	+	+	±	±
TS9	+	+	+	+	TL10	+	+	+	+
TS10	+	+	+	+	TL11	+	+	+	+
TL14/TS11	+	+	+	+	TL12	+	+	+	+
TS12	+	±	—	—	TL13	+	+	+	+
TL16/TS13	+	+	+	+	TL15	+	+	+	+
TS14	+	+	+	+	TL17	+	+	+	+
TS15	+	+	+	+	TL18	+	+	+	+
TS16	+	+	+	+	TL19	+	+	+	+
TS17	±	—	—	—	TL20	+	+	+	+
TS18	+	+	+	+	TL21	+	+	+	+
TS19	+	—	—	—	TL22	+	+	+	+
TS20	±	—	—	—	TL23	+	—	—	—
TL29/TS21	+	+	+	+	TL24	+	+	±	±
					TL25	+	+	+	+
					TL26	+	+	+	+
					TL27/TL28	+	+	+	+
					TL30				

Примечание. (+) — белок не модифицируется; (—) — белок модифицируется полностью, т. е. отсутствует на электрофореграмме; (±) — белок модифицируется частично, т. е. на электрофореграмме обнаруживается только часть белка; () — белок не анализировали.

Авторы выражают благодарность профессору А. С. Спирину за стимулирование и поддержку этих исследований; А. Т. Гудкову и М. Г. Бубуненко — за плодотворное обсуждение результатов и постоянный интерес к работе; О. И. Кондрахиной — за техническую помощь в проведении экспериментов.

ACCESSIBILITY OF RIBOSOMAL PROTEINS TO TRYPSIN
 IN *THERMUS THERMOPHILUS* RIBOSOMES

M. M. Yusupov, T. N. Spirina

Institute of Protein, Academy of Sciences
 of the USSR, Pushchino, Moscow Region

Summary

Proteins accessible to trypsin in ribosome and in ribosomal subunits from extreme thermophilic *Thermus thermophilus* have been analyzed. In 70S ribosomes 7 proteins of the small (30S) subunit, TS2, TS3, TS7, TS12, TS17, TS19, TS20 and 5 proteins of the large (50S) subunit, TL5, TL8, TL9, TL23, TL24 were accessible to trypsin. Dissociation of 70S ribosomes into subunits leads to no appearance of proteins accessible to trypsin. This confirms previous conclusion on the absence of ribosomal proteins between the subunits (Yusupov M. and Spirin A., FEBS Lett., 1986, 197, 229—233).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gudkov A. T., Gongadze G. M. The L7/L12 proteins change their conformational upon interaction of EF-G with ribosomes // FEBS Lett.— 1984.— 176, N 1.— P. 32—36.
2. Crichton R. R., Wittmann H. G. Ribosomal proteins. Trypsin digestion as a possible probe of the conformation of *E. coli* ribosomes // Mol. and Gen. Genet. — 1971. — 114, N 2. — P. 95—104.

3. Юсупов М. М., Спиринов А. С. Исследование поверхности рибосом и рибосомных субчастиц *E. coli* методом тритиевой бомбардировки // Биохимия. — 1986. — 51, № 11. — С. 1858—1867.
4. Гогия З. В., Юсупов М. М., Спирина Т. Н. Структура рибосом *Thermus thermophilus*. Метод выделения и очистки рибосом // Молекуляр. биология. — 1986. — 20, № 2. — С. 519—526.
5. Purification of the 30S ribosomal proteins // S. J. S. Hardy, G. G. Kurland, P. Voynow et al. // Biochemistry. — 1969. — 8, N 7. — P. 2897—2905.
6. Kanny J. W., Lambert J. M., Traut R. R. Cross-linking of ribosomes using 2-iminothiolane and identification of cross-linked proteins by diagonal polyacrylamide/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis // Meth. Enzymol. — 1979. — 59. — P. 539—650.
7. Crystallization of 70S ribosomes and 30S ribosomal subunits from *Thermus thermophilus* / C. D. Trakhanov, M. M. Yusupov, S. Ch. Agalarov et al. // FEBS Lett. — 1987. — 220, N 2 — P. 319—322.
8. Yusupov M. M., Spirin A. S. Are there proteins between ribosomal subunits? // Ibid. — 1986. — 197, N 2. — P. 229—233.

Ин-т белка АН СССР, Пущино
Ин-т молекуляр. генетики АН СССР, Москва

Получено 21.08.89

УДК 577.112.4:577.113.4

© Т. И. Головина, В. М. Солошенко, М. Г. Безруков, 1990

РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КОМПОНЕНТОВ БИОМАССЫ ДРОЖЖЕЙ. 1. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЛУТЕЛИНОВОЙ ФРАКЦИИ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КОМПОНЕНТОВ

В работе рассмотрены основные способы денуклеинизации биомассы дрожжей: гидролиз эндонуклеазами, взаимодействие с хаотропными солями, кислотная обработка. Показано, что при взаимодействии белков и нуклеиновых кислот определяющую роль играют гидрофобные взаимодействия. Для предотвращения соосаждения в изоэлектрической точке белков и нуклеиновых кислот последние должны быть гидролизованы до олигонуклеотидов с молекулярной массой около 800 и переведены в гидрофильное состояние, возможно, за счет отщепления гидрофобных оснований. Показано, что оптимальным способом достижения этого результата является кислотная обработка.

Введение. Биомасса микроорганизмов обычно содержит от 6 до 15 % нуклеиновых кислот. Белковые продукты пищевого назначения, полученные из микробной биомассы, согласно требованиям ФАО-ВОЗ, должны содержать не более 2 % нуклеиновых кислот [1]. Поэтому стадия разделения белков и нуклеиновых кислот имеет определяющее значение.

Принципиально возможным способом разделения таких компонентов является их фазовое распределение. Так, белки типа глобулинов и глютелинов могут быть переведены в твердую фазу путем изоэлектрического осаждения, а нуклеиновые кислоты оставлены в растворе, если они предварительно подвергнуты ферментативному или химическому гидролизу [2, 3], а также при наличии в системе хаотропных солей [4].

Настоящая работа посвящена исследованию механизмов взаимодействия глютелиновой фракции белков и нуклеиновых кислот в процессе выделения из биомассы микроорганизмов.

Материалы и методы. Работу проводили с пассивной биомассой пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, имеющей состав (%): белок — 48, нуклеиновые кислоты — 8, липиды — 10, углеводы — 20.

Для выделения внутриклеточных компонентов 10 %-ную суспензию биомассы дрожжей дезинтегрировали на баллистическом дезинтеграторе МЛ-1 (СКБ БП АН СССР, Пущино), рН дезинтегрированной биомассы доводили до нужного значения 1 н. HCl или NaOH, суспензию выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин и отделяли осадок центрифугированием. Экстракты являлись объектом дальнейшего исследования.