

1. Potapov A. P. A stereospecific mechanism for the aminoacyl-tRNA selection at the ribosome // FEBS Lett.—1982.—146, N 1.— P. 5—8.
2. Потанов А. П. Механизм стереоспецифической стабилизации кодон-антикодоновых комплексов на рибосомах в ходе трансляции // Журн. общ. биологии.—1985.—46, № 1.— С. 63—77.
3. McCarthy B. J., Holland J. J. Denaturated DNA as a direct template for *in vitro* protein synthesis // Biochemistry.—1965.—54, N 3.— P. 880—886.
4. Salas J., Bollum F. J. Biosynthetic polydeoxynucleotides as direct templates for polypeptide synthesis // J. Biol. Chem.—1968.—243, N 5.— P. 1012—1015.
5. Gillam I. C., Tener C. M. The use of BD-cellulose in separation of transfer RNA's // Meth. Enzymol.—1971.—20, pt C.— P. 55—70.
6. Nirenberg M., Leder P. RNA codewords and protein synthesis // Science.—1964.—145, N 3639.— P. 1399—1407.
7. Hamburger A. D., De Groot N., Lapidot Y. Peptidyl-tRNA. XI. The chemical synthesis of phenylalanine-containing oligopeptidyl-tRNA // Biochim. et biophys. acta.—1970.—213, N 1.— P. 115—123.
8. Гаврилова Л. П., Смолянинов В. В. Изучение механизма транслокации в рибосомах. 1. Синтез полифенилаланина в рибосомах *Escherichia coli* без участия гуанозин-5'-трифосфата и белковых факторов трансляции // Молекуляр. биология.—1971.—5, № 6.— С. 883—891.
9. Юсупова (Тналина) Г. Ж., Белицина Н. В., Спириин А. С. Рибосомный синтез пептидов из аминоксил-тРНК в отсутствие матричного полинуклеотида: синтез полифенилаланина из фенилаланил-тРНК^{Leu} // Биополимеры и клетка.—1986.—2, № 4.— С. 185—189.

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

Получено 11.12.86

УДК 577.963.3

ВЫДЕЛЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ БЕЛКОВ ИЗ 50S СУБЧАСТИЦЫ РИБОСОМ *THERMUS THERMOPHILUS*. КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ БЕЛКА TL7

С. Э. Седельникова

Введение. Изучение структуры рибосом и других компонентов белоксинтезирующей системы в последнее время выходит на уровень, связанный с возможностью применения рентгеноструктурного анализа. Лимитирующей стадией в таких исследованиях долгое время было получение кристаллов. Введение в лабораторную практику термофильных бактерий в качестве источника для получения компонентов белоксинтезирующей системы позволило приступить к решению этой проблемы. К настоящему времени получены кристаллы ряда рибосомных белков [1—3] и 50S субчастицы [4] из умеренно термофильной бактерии *Bacillus stearothermophilus*. Закристаллизованы 5S РНК [5], фактор элонгации полипептидной цепи G [6], 70S рибосома [7] из экстремально термофильной бактерии *Thermus thermophilus*. Данная работа посвящена выделению ряда индивидуальных белков из 50S субчастицы рибосом *T. thermophilus* и кристаллизации одного из них, TL7 (по номенклатуре рибосомных белков *T. thermophilus*, приведенной в работе [8]). Этот белок, по-видимому, является аналогом белка L6 из рибосом *Escherichia coli*.

Материалы и методы. Выращивание бактериальной массы и выделение рибосом проводили, как описано в работе [8]. Разделение рибосом на субчастицы также проводили, как в работе [8], с той разницей, что ионный состав градиента концентрации сахарозы при разделении был следующий: 0,01 М MgCl₂, 0,4 М NaCl, 0,001 М Na₂ЭДТА, 0,02 М трис-НСl, рН₂₀ 7,5. Рибосомные белки экстрагировали по [9] с модификациями. Процедура заключалась в следующем. К раствору 50S субчастиц с концентрацией 10 мг/мл, содержащему 0,02 М MgCl₂, 1 М NH₄Cl, 0,0005 М Na₂ЭДТА, 0,04 М трис-НСl, рН₂₀ 7,5 и нагретому до 60 °С, добавляли равный объем нагретого до 60 °С этанола. Смесь инкубировали 50 мин при 60—61 °С и умеренном перемешивании. Рибосомные частицы отделяли от экстрагированного белка центрифугированием при 35000 g, надосадочную жидкость собирали, а осадок, содержащий белокдефицитные частицы, растворяли в буфере, содержащем 2 М NH₄Cl, и повторяли обработку этанолом.

Хроматографическое разделение полученных белковых смесей проводили на СМ-сепарозе CL («Pharmacia», Швеция) без применения денатурирующих агентов в натрий-ацетатном буфере при рН 5,6 с градиентом концентрации NaCl от 0,04 до 0,7 М.

Белковый состав экстрактов и идентичность белков определяли по двухмерным электрофореграммам [10], чистоту оценивали по электрофореграммам, полученным в полиакриламидных гелях, содержащих 15 % акриламида, 0,75 % метиленабисакриламида, в присутствии DS-Na по Лемли [11].

Результаты и обсуждение. Стандартные, наиболее эффективные методы разделения рибосомных белков, включающие в себя селективное и кооперативное отделение белковых групп от субчастицы при обработке хлористым литием [12] или хлористым натрием [2], оказались непригодными для нашего объекта. Поэтому мы взяли за основу метода избирательной экстракции белков из рибосом *T. thermophilus* отделение

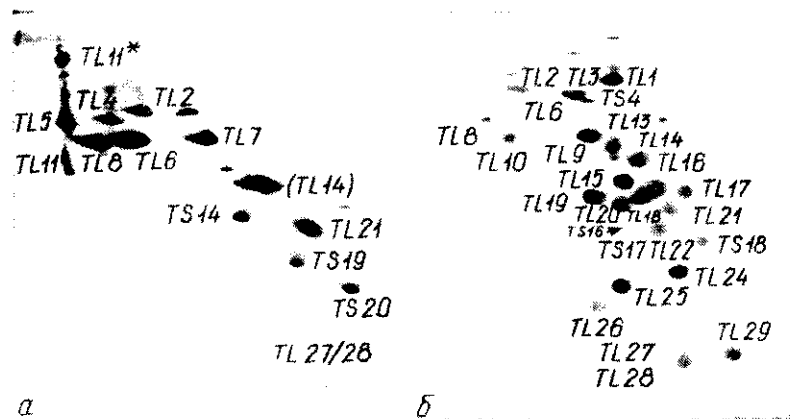


Рис. 1. Двухмерные электрофореграммы рибосомных белков *Thermus thermophilus*: а — белковый состав фракции 2 — белки, отделившиеся от 50S субчастицы в присутствии 1 М NH_4Cl и 50 %-ного этанола; б — белковый состав рибонуклеопротеидных частиц, образовавшихся в результате такой обработки. Номенклатура белков приведена по работе [8]

Fig. 1. Two-dimensional electrophoretic patterns of ribosomal proteins from *Thermus thermophilus*: а — protein composition of fraction 2 — split proteins of 50S subunits in 1 M NH_4Cl and 50 % ethanol; б — protein composition of core ribonucleoprotein particles. The nomenclature of proteins is given according to [8]

пентамерного белкового комплекса $(L7, L12)_2L10$ от рибосом *E. coli* [9], основанное на обработке рибосом 50 %-ным этанолом в присутствии 0,5 М NH_4Cl и 0,01 М MgCl_2 . Мы внесли в эту методику ряд модификаций, позволивших практически количественно отделить от 50S субчастицы восемь белков. Экстракцию белков проводили в два этапа. Первый — обработка 50S субчастиц 50 %-ным этанолом в 0,5 М NH_4Cl при 60 °С, второй — обработка полученных после первого этапа рибосомных частиц 50 %-ным этанолом в 1 М NH_4Cl при 60 °С. Таким образом, были получены две фракции рибосомных белков. Как показал двухмерный электрофоретический анализ этих фракций, первая из них содержала белки $TL2, TLA — TL8, TL11^*$ (аналог пентамерного комплекса $(L7, L12)_2L10$ из *E. coli*) и еще один белок, возможно $TL14$ (идентичность этого белка по двухмерным электрофореграммам достоверно установить не удалось). Вторая фракция содержала те же белки и еще некоторое количество белков $TL21, TL27/28$, а также белки $TS14, TS19, TS20$, наличие которых объясняется примесью 30S субчастиц в препарате 50S субчастиц. Анализ состава белков, оставшихся на рибосомных частицах после экстракции, показал, что белки $TL11^*, TL7$ экстрагировались практически полностью, $TL5$ и $TL4$ — не менее чем на 90—95 %, а $TL6, TL8, TL2$ — на 80—85 %. Остальные белки ($TL21, TL14, TL27/28$) экстрагировались частично (рис. 1). Следует отметить, что снижение температуры экстракции до 55 °С приводило к резкому снижению выхода всех экстрагированных белков, кроме $TL11^*$.

В результате хроматографического разделения белковых смесей были получены белки $TL11^*, TL7, TL2, TLA, TL5$ с чистотой не менее 95 % и белки $TL11, TL6, TL8$ с чистотой 75—85 %. Профиль элюции белков с колонки и результаты электрофоретического анализа пиков приведены на рис. 2.

Один из полученных белков, $TL7$, являющийся, по-видимому, аналогом белка $L6$ из рибосом *E. coli*, удалось закристаллизовать. Микрокристаллы, имеющие форму гексагональных стержней с отношением ширины к длине около 1 : 10, были получены ме-

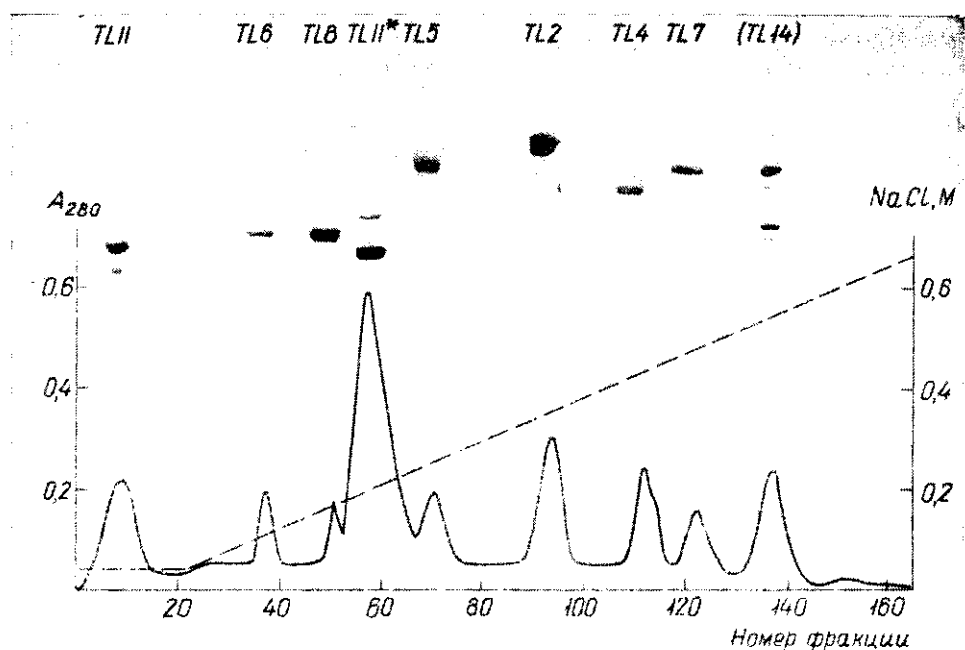


Рис. 2. Разделение смеси белков, полученной при обработке 50S субчастиц 0,5 M NH_4Cl и 50 %-ным этанолом (фракция 1). Колонка с CM-сефарозой CL объемом 30 мл. Количество нанесенного белка около 150 мг. Элюция белков с колонки градиентом концентрации NaCl от 0,04 до 0,7 M в натрий-ацетатном буфере при pH 5,6 в объеме 900 мл. Скорость элюции 10 мл/ч, объем фракции 5,8 мл. Приведены результаты анализа белкового содержания пиков электрофорезом по Демли [11]

Fig. 2. Separation of the protein mixture split from 50S subunits in 0.5 M NH_4Cl and 50 % ethanol (fraction 1). 150 mg of proteins were loaded on the 30 ml CM Sepharose column. Proteins were eluted from the column with 900 ml of NaCl gradient from 0.04 M to 0.7 M NaCl in Na-acetate buffer, pH 5.6. Flow rate—10 ml/h, fraction volume—5.8 ml. Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoretic patterns of protein composition of peaks are given according to Laemmli

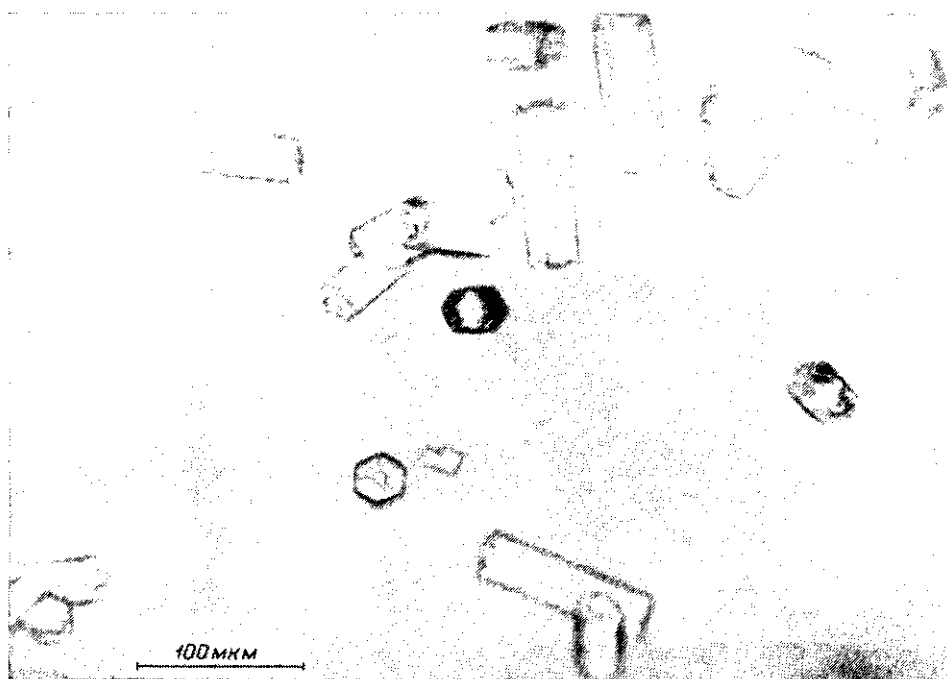


Рис. 3. Микрофотография кристаллов белка TL7
Fig. 3. Microphotographs of the protein TL7 crystals

тодом диффузии паров в «висящей» капле. В качестве осадителя использовали сульфат аммония. Кристаллизация происходила при комнатной температуре из раствора белка с концентрацией 1,5—2 мг/мл, содержащего 0,05 М MES-NaOH, pH 6,0—6,1 и сульфат аммония в концентрации 15 % насыщения. Противораствор содержал сульфат аммония в концентрации 41—43 % насыщения. Добавление к раствору белка 0,001 М MgSO₄ приводило к существенному уменьшению отношения ширины кристаллов к их длине, примерно до 1:4 (рис. 3). В настоящее время ведется работа по выращиванию кристаллов этого белка, пригодных для рентгеноструктурного анализа.

Автор благодарит М. Б. Гарбер за постоянное внимательное руководство, а также С. Ч. Агаларова за помощь при выполнении этой работы.

ISOLATION OF INDIVIDUAL PROTEINS FROM 50S SUBPARTICLES
OF *THERMUS THERMOPHILUS* RIBOSOMES.
CRYSTALLIZATION OF TL7 PROTEIN

S. E. Sedelnikova

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

S u m m a r y

A method of selective extraction is suggested for eight proteins of 50S subparticles of ribosomes from extremal-thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* at 60°C in the presence of 0.5 M and 1 M NH₄Cl and 50 % ethanol. As a result of chromatographic separation of extracted proteins on CM-sepharose CL five individual proteins (the purity is not less than 95 %) have been obtained. One of them, TL7 (probably, an analog of L6 protein from *E. coli* ribosomes), has been crystallized by the method of «hanging» drop with ammonium sulfate as a precipitant.

1. *The crystallization of ribosomal proteins from the 50S subunit of the Escherichia coli and Bacillus stearothermophilus ribosome* / K. Appelt, J. Dijk, R. Reinhardt et al. // J. Biol. Chem.—1981.—256, N 22.—P. 11787—11790.
2. *Proteins of the Bacillus stearothermophilus ribosome crystallization of protein L6* / K. Appelt, J. Dijk, S. W. White, K. S. Wilson // FEBS Lett.—1983.—160, N 1, 2.—P. 75—77.
3. *Liljas A., Newcower M. E. Purification and crystallization of a protein complex from Bacillus stearothermophilus ribosomes* // J. Mol. Biol.—1981.—153, N 2.—P. 393—398.
4. *Characterization of single crystals of the large ribosomal particles from Bacillus stearothermophilus* / A. Yonath, M. A. Saper, I. Makowski et al. // Ibid.—1986.—197, N 4.—P. 633—636.
5. *Morikawa K., Kawahami K., Takemura S. Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of 5S rRNA from Thermus thermophilus HB8* // FEBS Lett.—1982.—145, N 2.—P. 194—196.
6. *Reshetnikova L. S., Garber M. B. Crystallization of elongation factor G from an extreme thermophile Thermus thermophilus HB8* // Ibid.—1983.—154, N 2.—P. 149—150.
7. *Карпова Е. А., Сердюк И. Н. Кристаллизация рибосом из Thermus thermophilus* // Докл. АН СССР.—1986.—289, № 5.—С. 1263—1266.
8. *Гогия Э. В., Юсупов М. М., Спирина Т. Н. Структура рибосом Thermus thermophilus. 1. Метод выделения и очистки рибосом* // Молекуляр. биология.—1986.—20, № 2.—С. 519—526.
9. *Hamel E., Koka M., Nakamoto T. Requirement of an Escherichia coli 50S ribosomal protein component for effective interaction of the ribosome with T and G factors and with guanosine triphosphate* // J. Biol. Chem.—1972.—247, N 3.—P. 805—814.
10. *Kenny G. W., Lambert G. M., Traut R. R. Cross-linking of ribosomes using 2-iminothiolane (methyl-4-mercaptobutyrimidate) and identification of cross-linked proteins by diagonal polyacrylamide / sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis* // Meth. Enzymol.—1979.—59.—P. 534—550.
11. *Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4* // Nature.—1970.—227, N 5259.—P. 680—685.
12. *Туманова Л. Г., Гонгадзе Г. М., Гудков А. Т. Выделение всех белков из 50S частиц рибосомы Escherichia coli* // Молекуляр. биология.—1982.—16, № 4.—С. 807—813.

Ин-т белка АН СССР, Пушкино Моск. обл.

Получено 02.12.86