

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ АНАЛОГОВ АТФ И тРНК С ФЕНИЛАЛАНИЛ-тРНК СИНТЕТАЗОЙ

В. Н. Анкилова, В. А. Гордиенко, О. И. Лаврик, Н. А. Моор

Введение. Этенпроизводные нуклеотидов широко используются для изучения структурно-функциональной топографии ферментов, зависящих от нуклеотидов [1]. Получены производные тРНК различной специфичности, содержащие остатки этеноаденозина [2, 3]. Особый интерес представляет применение такого типа соединений в качестве аффинных реагентов для модификации белков.

В работе [4] впервые обнаружена возможность ковалентного присоединения 1,N⁶-этенoadенозин-5'-трифосфата (ϵ АТФ) к фенилаланил-тРНК синтетазе (КФ 6.1.1.20). Настоящая работа посвящена более детальному исследованию аффинной модификации фенилаланил-тРНК синтетазы с помощью ϵ АТФ. Получены флюоресцентные аналоги тРНК^{Phe} и исследовано их взаимодействие с синтетазой.

Материалы и методы. Фенилаланил-тРНК синтетазы из *Escherichia coli* MRE-600 выделена согласно [5]. тРНК^{Phe} из *E. coli* MRE-600 фирмы «Boehringer Mannheim» (Австрия). РНК-лигаза Т4 из *E. coli* производства НПО «Фермент» (Вильнюс). Щелочная фосфатаза из *E. coli* и тРНК из *E. coli* MRE-600 производства НПО «Биолар» (Олайн). АТФ [СТР] : тРНК нуклеотидилтрансфераза из *E. coli* любезно предоставлена А. С. Буториным. L-фенилаланин, аденозин, АТФ, GMP фирмы «Reanal» (Венгрия). Пуromицин фирмы «Serva» (ФРГ). L-[¹⁴C]фенилаланин (13,3 ТБк/моль), [¹⁴C]АТФ (17 ТБк/моль) — «UVVVR» (ЧССР). Пирофосфат натрия (0,4 ТБк/моль) производства ВО «Изотоп», Моск. отд-ние. Аденозин-3',5'-дифосфат (pAp) синтезировали из аденозина согласно [6]. ϵ АТФ синтезирован В. Н. Подустом. 1,N⁶-этенoadенозин-3',5'-дифосфат (p ϵ Ap) синтезировали из pAp по аналогии с методом получения ϵ АТФ [7]. 1,N⁶-этенoadенозин любезно предоставлен А. Т. Прудченко. Другие реактивы были квалификации «осч» или специально очищены стандартными методами.

Ступенчатое укорачивание тРНК^{Phe} с 3'-конца, присоединение pAp или p ϵ Ap к «укороченным» тРНК с помощью РНК-лигазы Т4, достраивание ССА-конца тРНК с помощью АТФ [СТР] : тРНК нуклеотидилтрансферазы проводили согласно [2] с неко-

Т а б л и ц а 1

Влияние лигандов на инактивацию фенилаланил-тРНК синтетазы при облучении с ϵ АТФ или этеноаденозином

Ligands influence on the phenylalanyl-tRNA synthetase inactivation under irradiation in the presence of ϵ АТФ or ethenoadenosine

Реагент, мМ	Лиганд	Лиганд, мМ	$k_{\text{каж}}^*$, мин ⁻¹	$k_{\text{каж}}^L$, мин ⁻¹	$k_{\text{каж}}^*/k_{\text{каж}}^L$
ϵ АТФ, 0,10	—	—	0,046	—	—
» »	АТФ	1,0	—	0,046	1,0
» »	GMP	1,0	—	0,060	0,8
» »	PP	5,0	—	0,052	0,9
» »	тРНК ^{Phe}	0,02	—	0,024	1,9
» »	тРНК ^{Phe} (—A)	0,02	—	0,026	1,8
» »	тРНК ^{Phe} +	0,02	—	—	—
» »	+L-Phe+	0,01	—	—	—
» »	+АТФ	2,0	—	0,026	1,8
» »	N-ацетилфенил-аланил-тРНК ^{Phe}	0,02	—	0,003	15
» »	Пуromицин	1,0	—	0,019	2,5
Этенoadенозин, 0,10	—	—	0,042	—	—
» »	тРНК ^{Phe}	0,02	—	0,024	1,8
» »	тРНК ^{Phe} (—A)	0,02	—	0,043	1,0

* $k_{\text{каж}}$ ($k_{\text{каж}}^L$) — кажущиеся константы скорости инактивации фермента в реакции аминокислотирования тРНК в отсутствие (присутствии) лигандов. Рассчитаны из кинетических кривых инактивации. Приведены средние значения 6—8 измерений, средние отклонения не превышали $\pm 15\%$.

торыми изменениями условий ферментативных реакций. После лигирования или ССА-дотраивания тРНК выделяли на ДЭАЭ-сефадексе А-25 («Pharmacia», Швеция). тРНК^{Phe}, содержащую 1,N⁶-этенoadенозин в 73-м положении, после аминоацилирования хроматографировали на Лихросфере Si-1000 («Merck», ФРГ). Меченые препараты тРНК^{Phe} получали, используя в реакции с нуклеотидилтрансферазой [¹⁴C]АТР. Целостность структуры препаратов тРНК^{Phe} анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле.

Спектры флюоресценции этенированных нуклеотидов и тРНК регистрировали на спектрофлюориметре «Hitachi» MPF-2A (Япония).

Для облучения фенилаланил-тРНК синтетазы с этенопроизводными АТР или тРНК^{Phe} использовали азотный лазер ЛГИ-21 с длиной волны излучения 337 нм. Реакционная смесь (объемом 50—100 мкл) содержала 0,02 М калий-фосфатный буфер, рН 7,5, 0,01 М MgCl₂, 1,5 мг/мл (5 мкМ) фермента, 0,1—0,5 мМ εАТР. Концентрации других лигандов указаны в табл. 1. Смесь облучали в течение 1—2 ч. Отбирали аликвоты (5—10 мкл) через определенные интервалы времени для измерения активности белка в реакциях аминоацилирования тРНК [5] или АТР-^[32P]пирофосфатного обмена [8]. В опытах с производными тРНК^{Phe} смесь содержала 10—50 мкМ тРНК_{εА76} или 0,5—5 мкМ тРНК_{εА73}. Смесь облучали в течение 5 ч. Препараты тРНК^{Phe} предварительно обрабатывали перекисью водорода согласно [9].

Уровень ковалентного присоединения [¹⁴C]εАТР или [¹⁴C]тРНК_{εА73} к фенилаланил-тРНК синтетазе определяли после отделения белка от остальных компонентов реакционной смеси гель-фильтрацией на сефадексе G-100, уравновешенном 0,05 М трис-HCl-буфером, рН 8,0, содержащим 0,5 М KCl, как описано в [4].

Образование комплекса фенилаланил-тРНК синтетазы с аминоациладенилатом определяли сорбцией на ДЭАЭ-целлюлозных фильтрах («Whatman», Англия) по методу [10].

При исследовании ингибирующего действия аналогов тРНК^{Phe} смесь для аминоацилирования содержала 0,1—1,2 мкМ тРНК^{Phe}, 1—6 мкМ аналог тРНК^{Phe} и остальные компоненты согласно [5]. Тип ингибирования и величины K_m и K_i определяли, используя координаты Лайнхувсера — Бэрка и прямой линейный график Корниш — Боудена и Эйзенталь.

Результаты и обсуждение. Ранее было показано, что εАТР ковалентно присоединяется к фенилаланил-тРНК синтетазе при облучении светом с длиной волны 337 нм [4]. При этом наблюдается инактивация фермента в реакции аминоацилирования тРНК, что указывает на специфичность модификации. Величина K_i для εАТР, найденная из зависимости величин $k_{каж}$ процесса инактивации от концентрации аналога (0,1 мМ), близка величине K_m для АТР. Однако другой важный критерий аффинной модификации — защита специфическим субстратом от модификации аналогом — в этом случае не используется [4]. Как АТР (1,0 мМ), так и АТР совместно с фенилаланином в условиях образования фенилаланиладенилата не защищают фермент от инактивации. Поэтому потребовалось более детальное изучение взаимодействия εАТР с ферментом.

εАТР является субстратом фенилаланил-тРНК синтетазы из *E. coli* MRE-600 в реакции аминоацилирования тРНК [7]. В то время как фермент не катализирует реакции обмена между εАТР и [³²P]пирофосфатом, образование промежуточного комплекса фенилаланил-тРНК синтетазы с фенилаланилэтенoadенилатом было зарегистрировано методом сорбции на ДЭАЭ-целлюлозных фильтрах. Как видно из кривых, приведенных на рис. 1, активация фенилаланина в присутствии εАТР происходит с меньшей эффективностью, чем в присутствии АТР. Таким образом, введение этеногруппы в молекулу АТР приводит к нарушению правильных контактов нуклеотида с АТР-узнающим участком фермента. В пользу этого свидетельствуют данные о том, что этенопроизводные АТР и аденозина не индуцируют синергизма в связывании фенилаланинола и фенилаланина соответственно [11]. По-видимому, нарушение специфических взаимодействий затрудняет обмен между εАТР и пирофосфатом и снижает эффективность аминоацилирования тРНК с участием промежуточного комплекса фермента с фенилаланилэтенoadенила-

том (V_{\max} для ϵ АТР составляет 1—2 % от V_{\max} для АТР в реакции аминоацилирования тРНК^{Phe} [7]).

На рис. 2 приведены кинетические кривые инактивации фенилаланил-тРНК синтетазы при облучении с ϵ АТР в реакциях аминоацилирования тРНК и АТР-³²Р пирофосфатного обмена. Уровень инактивации фермента в реакции аминоацилирования значительно глубже, чем в реакции обмена, что может указывать на взаимодействие ϵ АТР с участками фермента, более важными для функциональной активности фермента в полной реакции синтеза аминоксил-тРНК, чем для активации аминокислоты.

Данные табл. 1 по влиянию различных лигандов на инактивацию фенилаланил-тРНК синтетазы при облучении с ϵ АТР показывают, что

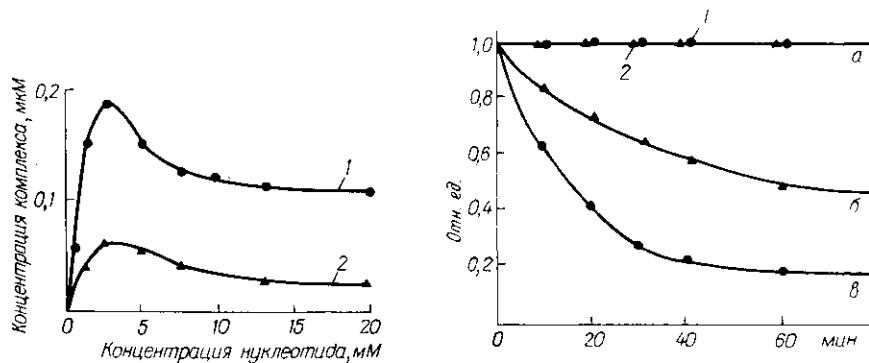


Рис. 1. Образование комплекса фенилаланил-тРНК синтетазы с аминоксиладенилатом (1) и аминоксилэтенаденилатом (2) в присутствии различных концентраций АТР или ϵ АТР. Реакционная смесь содержит 0,05 М трис-НСl, рН 7,5, 0,4 мМ дитиотреитол, 10 мМ MgCl₂, 20 мкМ L-[¹⁴C]фенилаланин, 0,1 мкМ фермент, 0,5—20 мМ АТР или ϵ АТР

Fig. 1. Complex formation of phenylalanyl-tRNA synthetase with aminoacyladenylate (1) and aminoacylethadenylate (2) in the presence of different ATP or ϵ ATP concentrations. Reaction mixture contains 0.05 M tris-HCl, pH 7.5, 0.4 mM dithiothreitol, 10 mM MgCl₂, 20 μM L-[¹⁴C]phenylalanine, 0.1 μM enzyme, 0.5—20 mM ATP or ϵ ATP

Рис. 2. Зависимость активности фенилаланил-тРНК синтетазы в реакциях аминоацилирования тРНК (1) и АТР-³²Р пирофосфатного обмена (2) от времени облучения в отсутствие (а) и присутствии (б, в) 0,1 мМ ϵ АТР

Fig. 2. Irradiation time dependence of the phenylalanyl-tRNA synthetase activity in the tRNA aminoacylation reaction (1) and the АТР-³²Р pyrophosphate exchange reaction (2) in the absence (a) or in the presence (б, в) of 0.1 mM ϵ ATP

GMP, нуклеотидный эффектор фенилаланил-тРНК синтетазы [12], и пиросфосфат не оказывают защитного действия. Достаточно заметный защитный эффект проявляет тРНК^{Phe}. Этот результат позволил предположить, что ϵ АТР взаимодействует с участком связывания 3'-концевого аденозина тРНК. Отсутствие полной защиты может быть объяснено не абсолютно точным взаимодействием ϵ АТР с этим участком фермента либо тем, что акцепторный конец тРНК не образует прочного контакта с белком в отсутствие других субстратов.

Можно ожидать большей конкуренции между ϵ АТР и 3'-концом аминоксил-тРНК за взаимодействие с ферментом. Защитный эффект фенилаланил-тРНК, образуемой *in situ*, не отличается от влияния тРНК, что может быть связано с нестабильностью продукта реакции аминоацилирования тРНК (в условиях модификации время полугидролиза фенилаланил-тРНК^{Phe} ~ 30 мин). В присутствии устойчивого аналога аминоксил-тРНК — N-ацетилфенилаланил-тРНК^{Phe} — наблюдается практически полная защита фермента от инактивации под действием ϵ АТР (табл. 1).

В качестве соединения, моделирующего 3'-концевой аденозин, аминоксил-тРНК, был использован пурамицин. На взаимодействие пурамицина с тРНК- либо аминоксил-тРНК-узнающим

участком фенилаланил-тРНК синтетазы указывает ингибирование этим соединением реакции аминоацилирования тРНК^{Phe} при отсутствии ингибирования реакции АТР-[³²P]пирофосфатного обмена. Пурамицин значительно снижает уровень инактивации фенилаланил-тРНК синтетазы при облучении с ϵ АТР (данные показаны в табл. 1).

Для дальнейшей проверки предположения о взаимодействии ϵ АТР с участком связывания 3'-концевого аденозина тРНК исследовано влияние тРНК^{Phe} без 3'-концевого аденозина (тРНК^{Phe}(-А)) на инактивацию фермента с помощью ϵ АТР. В этом случае наблюдается такой же защитный эффект, что и в присутствии тРНК^{Phe} (табл. 1). Этот резуль-

тат может быть объяснен слабой конкуренцией ϵ АТР с 3'-концевым аденозином тРНК^{Phe} за взаимодействие с ферментом.

Таблица 2

Аминоацилирование укороченных тРНК^{Phe} и продуктов их лигирования
Aminoacylation of «shortened» tRNA^{Phe} derivatives and their ligation products

тРНК	АТР(СТР): тРНК нуклеотидил- трансфераза	Предельное аминоацили- рование, пиколь Phe/А ₂₅₀ (%)
тРНК ^{Phe}	—	1500 (100)
тРНК(-А)	+	1050 (70)
тРНК(-А)*	—	570 (38)
тРНК(-А)*	+	960 (64)
тРНК ϵ A76	—	≤15 (≤1)
тРНК ϵ A76	+	510 (34)
тРНК(-АССА)	+	60 (4)
тРНК ϵ A73(-ССА)	+	370 (25)

Примечание. тРНК(-А), тРНК(-ССА), тРНК(-АССА) — тРНК^{Phe}, укороченная на один, три или четыре нуклеотида с 3'-конца; тРНК ϵ A76, тРНК ϵ A73 — тРНК^{Phe}, содержащая этеноаденозин в 76-м или 73-м положениях соответственно. * — тРНК(-А), лигированная в присутствии рАР и затем обработанная щелочной фосфатазой.

Таблица 3

Величины K_m и K_i аналогов
тРНК^{Phe}
 K_m and K_i of tRNA^{Phe}
analogues

Аналог тРНК ^{Phe}	K_m , мкМ	K_i , мкМ
тРНК ^{Phe}	0,3	—
тРНК(-А)	—	3,8
тРНК(-ССА)	—	4,8
тРНК(-АССА)	—	5,6
тРНК ϵ A76	—	1,2
тРНК ϵ A73	0,5	—

Примечание. Приведены средние значения 2—6 измерений, средние отклонения величин 15—20 %.

Для сравнения подобные эксперименты были проведены с 1,N⁶-этенаденозином. ϵ АТР и этенаденозин (в равных концентрациях) в одинаковой степени инактивируют фенилаланил-тРНК синтетазу (табл. 1). В присутствии тРНК^{Phe} наблюдается такой же защитный эффект от инактивации этенаденозином, что и при облучении с ϵ АТР. Однако тРНК^{Phe}, лишенная 3'-концевого аденозина, в этом случае не оказывает защитного влияния. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что в случае этенаденозина происходит более точная «адресовка» в участок узнавания 3'-концевого аденозина тРНК. В то время как наличие трифосфатной группы в ϵ АТР приводит, по-видимому, к частичному нарушению специфических взаимодействий нуклеозидной части ϵ АТР с этим участком фермента.

При определении уровня ковалентного присоединения [¹⁴C] ϵ АТР к фенилаланил-тРНК синтетазе в присутствии других лигандов получены результаты, согласующиеся с данными по защите фермента от инактивации. Наиболее эффективно на неприсоединение ϵ АТР к белку влияет N-ацетилфенилаланил-тРНК^{Phe} (0,13 моль ϵ АТР на моль фермента в отсутствие и 0,03 моль ϵ АТР на моль фермента в присутствии N-ацетилфенилаланил-тРНК^{Phe}).

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о том, что введение этеногруппы в молекулу АТР искажает характер специфического взаимодействия нуклеотида с фенилаланил-тРНК синтетазой. Хотя ϵ АТР проявляет субстратную активность, однако при этом нарушаются контакты с АТР-узнающим центром. Этот тип взаимодей-

ствия ϵ АТР с ферментом не обнаруживается с помощью фотоиндуцируемой модификации. Наиболее вероятно, что ковалентное присоединение ϵ АТР происходит в области связывания 3'-конца тРНК.

Представляло интерес изучение возможности аффинной модификации аминоацил-тРНК синтетаз с помощью производных тРНК, содержащих этенонуклеотиды, поскольку в этом случае следует ожидать более специфической «адресовки» реакционноспособной группы в активный центр фермента. В литературе описаны производные тРНК^{Phe} из дрожжей и тРНК^{Met} из *E. coli*, содержащие остатки этеноаденозина в определенных положениях акцепторного конца тРНК [2, 3]. Разработанный метод использовал пами для получения производных тРНК^{Phe} из *E. coli*, содержащих этеноаденозин в 76-м или 73-м положениях.

Уровень присоединения р ϵ Ар к укороченным с 3'-конца на один, три или четыре нуклеотида тРНК определяли по восстановлению акцепторной активности продуктов лигирования. После отщепления 3'-концевого фосфата в продуктах лигирования щелочной фосфатазой проводили их аминоацелирование в присутствии или отсутствии АТР [СТР]: тРНК нуклеотидилтрансферазы, способной достраивать 3'-ССА-конец тРНК. В контрольных экспериментах в качестве донора РНК лигазной реакции использовали рАр. Данные представлены в табл. 2. Полного восстановления акцепторной активности укороченных тРНК с помощью нуклеотидилтрансферазной реакции не удалось достичь вследствие частичной фрагментации тРНК. Уровень включения рАр в тРНК^{Phe} без 3'-концевого нуклеотида составляет 38%. тРНК _{ϵ 76} не ацелируется фенилаланином, как и аналогичное производное тРНК^{Phe} из дрожжей [2]. Из сравнения акцепторной активности тРНК _{ϵ 76} и тРНК(—А), лигированной в аналогичных условиях с помощью рАр, после предварительной инкубации с нуклеотидилтрансферазой можно оценить, что уровень присоединения р ϵ Ар к тРНК(—А) составляет не менее 30%.

тРНК _{ϵ 73}, полученная путем лигирования тРНК^{Phe}, укороченной на четыре нуклеотида, с помощью р ϵ Ар и последующей достройки ССА-конца, сохраняет способность аминоацелироваться. Восстановление акцепторной активности происходит на 17—25% по сравнению с исходной тРНК^{Phe}. Полученный препарат тРНК _{ϵ 73} был обогащен в два раза с помощью обратнотазовой хроматографии.

В табл. 3 приведены величины K_m и K_i для различных тРНК, модифицированных по акцепторному концу. Удаление 3'-концевого нуклеотида снижает на порядок сродство тРНК к фенилаланил-тРНК синтетазе. Дальнейшее укорачивание тРНК с 3'-конца на три или четыре звена мало влияет на уменьшение эффективности комплексообразования тРНК с ферментом. Замена 3'-концевого аденозина на этеноаденозин приводит к утрате способности тРНК^{Phe} акцентировать фенилаланин. Таким образом, 3'-концевой аденозин тРНК^{Phe} необходим не только для субстратной активности, но является, по-видимому, наиболее важным компонентом в 3'-концевой ССА-последовательности для продуктивного связывания тРНК^{Phe} с ферментом. Аналогичные результаты были получены ранее для тРНК^{Phe} из *E. coli* K-12 [13]. Замена аденозина в 73-м положении на этеноаденозин не влияет на субстратные свойства тРНК^{Phe} и в незначительной степени уменьшает сродство к синтетазе.

Оба аналога тРНК^{Phe}, содержащие этеноаденозин, являются флуоресцентными. $\lambda_{\text{макс}}$ спектров флуоресценции тРНК _{ϵ 73} и тРНК _{ϵ 76} соответствуют $\lambda_{\text{макс}}$ спектра флуоресценции этеноаденозина. При облучении светом лазера интенсивность флуоресценции тРНК _{ϵ 73} и тРНК _{ϵ 76} уменьшается, что может свидетельствовать о фотохимическом превращении этеноаденозина в составе тРНК. Во избежание дополнительной фотореакции с участием 4-тиоуридина при УФ-облучении [14] все препараты тРНК^{Phe} и ее аналогов перед облучением обрабатывали перекисью водорода. 4-тиоуридин окисляется до уридина [9], при этом величина K_m для тРНК^{Phe} не меняется.

При облучении фенилаланил-тРНК синтетазы в присутствии тРНК_{εA73} инактивации фермента не наблюдалось. Уровень ковалентного присоединения [¹⁴C]тРНК_{εA73} к ферменту при эквимольном соотношении биополимеров не превышал 0,01 моль аналога на моль белка. За 5 ч облучения не более 1 % тРНК обнаруживается в ковалентном комплексе с белком. В то же время, учитывая высокое сродство тРНК_{εA73} к ферменту, можно считать, что в опытах с использованием 5—10-кратного избытка фермента по отношению к тРНК_{εA73} (см. «Материалы и методы») основная доля тРНК находится в комплексе с белком.

При облучении фенилаланил-тРНК синтетазы в присутствии тРНК_{εA76} инактивации фермента также не обнаружено.

Таким образом, полученные производные тРНК^{Phe} оказались не эффективными для аффинной модификации фенилаланил-тРНК синтетазы. Фотопревращение этенопроизводных тРНК^{Phe} происходит медленнее по сравнению с этеноаденозином: интенсивность флюоресценции тРНК_{εA73} и тРНК_{εA76} уменьшается при облучении в течение 5 ч на 20 %, а в случае этеноаденозина на 80 %. Низкий выход продукта фотоиндуцируемой модификации может быть объяснен рассеиванием энергии поглощенного света на другие основания в структуре тРНК^{Phe}, находящиеся в стеккинг-взаимодействиях с этеноаденозином. В пользу существования этих взаимодействий указывает тушение флюоресценции этеноаденозина в составе этенопроизводных тРНК^{Phe}, флюоресценция которых увеличивается в 5—6 раз после щелочного гидролиза.

Авторы благодарны Н. В. Булычеву за проведение ряда экспериментов, В. Н. Подусту и Г. А. Невинскому за предоставление препаратов εАТФ и А. С. Буторину за препарат АТФ [СТР] : тРНК нуклеотидилтрансферазы.

INTERACTION OF FLUORESCENT ATP AND tRNA ANALOGS WITH PHENYLALANYL-tRNA SYNTHETASE

V. N. Ankilova, V. A. Gordienko, O. I. Lavrik, N. A. Moor

Institute of Bioorganic Chemistry,
Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

Summary

Affinity modification of *E. coli* MRE-600 phenylalanyl-tRNA synthetase by 1,N⁶-etheno-adenosine-5-triphosphate (εATP) in the presence of different ligands has been investigated. ATP conversion into εATP results in the disturbance of specific contacts of nucleotide with the ATP binding site in the enzyme. The εATP covalent attachment site is assumed to be situated in the tRNA 3'-terminus recognizing site.

Fluorescent tRNA^{Phe} analogs have been prepared by replacing adenosine 73 or 76 by 1,N⁶-ethenoadenosine. The activity of these analogs has been investigated in the aminoacylation. The low yield of photoinduced covalent attachment of these derivatives to phenylalanyl-tRNA synthetase is observed.

1. Иванов М. В., Кост А. А. Исследование белков с помощью этенопроизводных аденина и цитозина // Успехи биол. химии.— 1980.—21.— С. 112—129.
2. Paulsen H., Wintermeyer W. Incorporation of 1,N⁶-ethenoadenosine into the 3'-terminus of tRNA using T4 RNA ligase. 1. Preparation of yeast tRNA^{Phe} derivatives // Eur. J. Biochem.— 1984.—138, N 1.— P. 117—123.
3. Paulsen H., Wintermeyer W. Incorporation of 1,N⁶-ethenoadenosine into the 3'-terminus of tRNA using T4 RNA ligase. 2. Preparation and ribosome interaction of fluorescent *Escherichia coli* tRNA^{Met} // Ibid.— P. 125—130.
4. Подуст В. Н., Невинский Г. А., Лаврик О. И. Модификация фенилаланил-тРНК синтетазы из *Escherichia coli* с помощью 1,N⁶-этенoadенозин-5'-трифосфата // Биополимеры и клетка.— 1985.—1, № 5.— С. 267—270.
5. Анкилова В. Н., Лаврик О. И., Ходырева С. Н. Очистка и некоторые свойства фенилаланил-тРНК синтетазы из *Escherichia coli* MRE-600 // Прикл. биохимия и микробиология.— 1984.—20, № 2.— С. 208—216.

6. *Synthesis of modified nucleoside 3',5'-biphosphates and their incorporation into oligoribonucleotides with T4 RNA ligase* / J. R. Barrio, M. C. G. Barrio, N. J. Leonard et al. // *Biochemistry*.— 1978.— 17, N 11.— P. 2077—2081.
7. *Фенилаланил-тРНК синтетазы из Escherichia coli: модификация фермента флюоресцентными химически активными аналогами нуклеотидов* / Г. А. Невинский, В. Н. Подуст, В. Н. Анкилова, О. И. Лаврик // *Биоорг. химия*.— 1983.— 9, № 7.— С. 936—946.
8. *Горшкова И. И., Даций И. И., Лаврик О. И.* Роль остатков аргинина во взаимодействии фенилаланил-тРНК синтетазы с субстратами // *Молекуляр. биология*.— 1980.— 14, № 1.— С. 118—124.
9. *Shugart L.* Effect of selective chemical modification of 4-thiouridine of phenylalanine transfer ribonucleic acid on enzyme recognition // *Arch. Biochem. and Biophys.*— 1972.— 148, N 2.— P. 488—495.
10. *Bartmann P., Hanke T., Holler E.* Active site stoichiometry of L-phenylalanine: tRNA ligase from *Escherichia coli K-10* // *J. Biol. Chem.*— 1975.— 250, N 19.— P. 7668—7674.
11. *Аденозин- и этеноаденозин-5'-триметафосфаты: влияние образования ковалентной связи на состояние аффинной метки в комплексе с фенилаланил-тРНК синтетазой* / Г. А. Невинский, В. Н. Подуст, С. Н. Ходырева и др. // *Молекуляр. биология*.— 1984.— 18, № 5.— С. 1311—1315.
12. *Lavrik O. I., Nevinsky G. A.* Phenylalanyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli MRE-600*. Activation by nucleotides and affinity modification of the effector binding sites // *FEBS Lett.*— 1980.— 109, N 1.— P. 13—17.
13. *Tal J., Deutscher M. P., Littauer U. Z.* Biological activity of *Escherichia coli* tRNA^{Phe} modified in its C-C-A terminus // *Eur. J. Biochem.*— 1972.— 28, N 2.— P. 478—491.
14. *Holler E., Baltzinger M., Favre A.* Catalytic mechanism of phenylalanyl-tRNA synthetase of *Escherichia coli K-10*. Different properties of native and photochemically cross-linked tRNA^{Phe} can be explained in the light of tRNA conformer equilibria // *Biochemistry*.— 1981.— 20, N 5.— P. 1139—1147.

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

Получено 15.12.86

УДК 576.315.42:577.23

КАПИЛЛЯРНАЯ ЭЛАСТОВИСКОЗИМЕТРИЯ НУКЛЕОИДОВ ЭУКАРИОТ

Д. Ю. Блохин, В. А. Стручков

Введение. Структурная организация ДНК в интерфазном ядре эукариот является одной из центральных проблем молекулярной биологии, которой посвящен ряд обзоров последних лет [1, 2]. Одним из надмолекулярных уровней организации ДНК является ее складчато-петлевая структура с участием ядерного скелета, сохраняющаяся в составе нуклеоидов [3—5].

Ряд основных выводов о структуре и свойствах нуклеоидов получен на основании анализа их седиментационной подвижности в градиентах концентраций нейтральной сахарозы [3, 6—8], хотя некоторыми авторами использованы вязкози- [9] и эластовискозиметрические [10, 11] методы исследования. Изучены некоторые свойства нуклеоидов, выделенных из разных клеток [3, 5, 12].

Однако отсутствие стандартной процедуры выделения и анализа нуклеоидов в ряде случаев затрудняет сопоставление результатов разных авторов. Одновременно с этим достаточно трудоемкие методы седиментационного анализа ограничивают возможности исследований.

В этой связи актуальной задачей является поиск простого и информативного аналитического приема и стандартизация условий выделения нуклеоидов по ряду параметров. Решение этой задачи даст возможность существенно расширить круг объектов исследования для сравнительного изучения нуклеоидов и может открыть новые подходы к исследованию структурной организации этих комплексов.

Для изучения реологических свойств препаратов «надмолекулярной ДНК» нами был предложен капиллярный эластовискозиметр [13,