

LOCALIZATION OF FUNCTIONALLY IMPORTANT GENOME  
REGIONS OF THE *GALLERIA MELLONELLA* L. NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS  
ON THE PHYSICAL MAP OF THE VIPAL GENOME

V. A. Mordvinov, I. Kh. Urmanov, N. G. Kholodilov, I. V. Nikonov

Institute of Molecular Biology, Koltsovo, Novosibirsk

Summary

Three regions are localized on the physical DNA map using *Bam*HI and *Eco*RI restriction endonucleases. Two regions have *ori* function and the third one possesses a promoter function in the procaryotic system.

1. Анализ ДНК вируса ядерного полиэдроза большой вошинной моли с помощью эндонуклеаз рестрикции и ее клонирование в клетках *E. coli* / В. А. Мордвинов, И. Х. Урманов, Н. Г. Холодилов, А. А. Ильичев.— Молекуляр. биология, 1983, вып. 34, с. 70—73.
2. Nucleotide sequence of the *Galleria mellonella* NPV origin of DNA replication / V. M. Blinov, V. V. Gutorov, N. G. Holodilov et al.— FEBS Lett., 1984, 167, N 2, p. 254—258.
3. Конструирование и свойства вектора для клонирования промоторсодержащих фрагментов ДНК. Клонирование промоторов *E. coli* и бактериофага T7 / О. И. Серпинский, Е. А. Каргинова, Н. Н. Микрюков и др.— Биоорг. химия, 1982, 8, № 6, с. 840—847.
4. Урманов И. Х., Кравченко В. В. Характеризация генома вируса ядерного полиэдроза *Galleria mellonella* с помощью эндонуклеаз рестрикции. Картирование мест расщепления *Bam*HI на кольцевой ДНК вируса.— В кн.: Структура и функции плазмид: Тез. докл. V. Всесоюз. совещ. по прогр. «Плазида». М., 1980, с. 215.

ВНИИ молекуляр. биологии  
Главмикробиопроба при СМ СССР,  
пос. Кольцово Новосибирской обл.

Получено 22.01.85

УДК 577.152.611

МОДИФИКАЦИЯ ФЕНИЛАЛАНИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗЫ ИЗ *E. COLI*  
С ПОМОЩЬЮ 1,N<sup>6</sup>-ЭТЕНОАДЕНОЗИН-5'-ТРИФОСФАТА

В. Н. Подуст, Г. А. Невинский, О. И. Лаврик

**Введение.** 1,N<sup>6</sup>-Этеноаденозин-5'-трифосфат ( $\Sigma$ АТР)\* широко используется для изучения различных нуклеотидзависимых ферментов [1], в том числе и для исследования АТР-узнающих участков аминоксил-тРНК-синтетаз [2, 3] как в качестве флюоресцирующего аналога субстрата, так и флюоресцентной метки.  $\Sigma$ АТР является субстратом в реакции аминокислирования тРНК, катализируемой фенилаланил-тРНК-синтетазой из *E. coli* [2].

В литературе отсутствуют данные о зависимых от УФ-света превращениях этенированных нуклеотидов. В то же время  $\Sigma$ АТР по сравнению с АТР хорошо поглощает свет в области 300—350 нм. Это обстоятельство позволило нам надеяться на возбуждение молекулы этенонуклеотида монохроматическим светом азотного лазера с длиной волны 337 нм с последующим ковалентным присоединением аналога нуклеотида к белку. Возможность подобного введения метки в белок представляется особенно перспективной ввиду того, что белки практически не поглощают свет с длиной волны выше 300 нм.

В связи с этим в работе исследована возможность прямого фотоприсоединения  $\Sigma$ АТР к фенилаланил-тРНК-синтетазе *E. coli* под действием монохроматического света азотного лазера.

**Материалы и методы.** Фенилаланил-тРНК-синтетаза из *E. coli* MRE-600 была выделена, согласно [4]. тРНК из *E. coli* MRE-600 была получена, согласно [5]. АТР, L-фенилаланин фирмы «Reanal», Венгрия. L-[<sup>14</sup>C]-фенилаланин (360 Ки/моль) —

\* Здесь и далее вместо  $\Sigma$ АТР следует читать  $\epsilon$ АТР.

«UVVVR», СССР; [ $^{14}\text{C}$ ]-АТФ (360 Ки/моль) — «СЕА», Франция.  $\Sigma\text{АТФ}$  и [ $^{14}\text{C}$ ]- $\Sigma\text{АТФ}$  (360 Ки/моль) получены, согласно [2]. Все другие препараты, использованные в работе, были квалитационно ос. ч. либо специально перекристаллизованы. В работе использован сефадекс G-100, 40—120 меш («Pharmacia», Швеция).

Для облучения фермента с лигандами использовали азотный лазер с длиной волны 337 нм, с частотой 50 Гц и мощностью светового потока  $5 \cdot 10^{14}$  квант/с (ЛГИ-21). Реакционная смесь при облучении содержала 0,02 М  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,5,  $10^{-3}$  М  $\text{MgCl}_2$ , 1 мг/мл фенилаланил-тРНК-синтетазы,  $10^{-5}$ — $5 \cdot 10^{-3}$  М  $\Sigma\text{АТФ}$  либо [ $^{14}\text{C}$ ]- $\Sigma\text{АТФ}$ . Из облучаемой смеси отбирали аликвоты через установленные временные интервалы для определения активности фермента и стехиометрии ковалентного присоединения аналога.

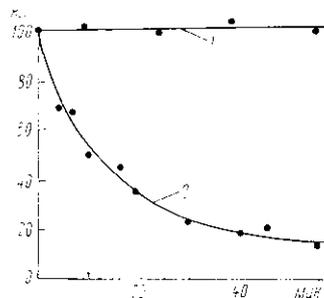


Рис. 1. Зависимость остаточной активности (А) фермента в реакции аминоацелирования тРНК от времени облучения в отсутствие (1) и в присутствии  $\Sigma\text{АТФ}$  ( $5 \cdot 10^{-4}$  М) (2).

Fig. 1. Irradiation time dependence of the enzyme activity (A) in the tRNA aminoacylation reaction in the absence (1) or presence (2) of  $\Sigma\text{АТФ}$  ( $5 \cdot 10^{-4}$  М).

Отобранные аликвоты (1—3 мкл) вносили в охлажденный 0,05 М трис-НСl буферный раствор, pH 7,5 (40—80 мкл), содержащий 0,1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, затем — в смеси для определения активности фермента в реакции аминоацелирования тРНК [2]. Стехиометрию ковалентного присоединения [ $^{14}\text{C}$ ]- $\Sigma\text{АТФ}$  к белку определяли после отделения избытка непрореагировавшего аналога методом гель-фильтрации на сефадексе G-100, уравновешенном 0,05 М трис-НСl буфером, pH 8,5, содержащим 0,5 М KCl. Элюат собирали по каплям (1—2) на мишени из бумаги FN-16 (2×2 см). Мишени сушили и определяли их радиоактивность. Профиль оптической плотности белка определяли по поглощению при 280 нм с помощью микроспектрофотометра «Обь». Молекулярную массу фермента считали равной 288 000 и  $A_{\text{мг/мл}}^{1\text{ см}}$  — 0,9 ед., согласно [4]. Электрофорез фермента, модифицированного [ $^{14}\text{C}$ ]- $\Sigma\text{АТФ}$ , проводили в условиях денатурации белка, согласно [4].

**Результаты и обсуждение.** Ранее было показано, что  $\Sigma\text{АТФ}$  является субстратом в реакции аминоацелирования тРНК, катализируемой фенилаланил-тРНК-синтетазой из *E. coli* [2]. Это позволило надеяться на возможность специфического мечения активных центров фермента с помощью  $\Sigma\text{АТФ}$ . На рис. 1 показана зависимость скорости реакции аминоацелирования тРНК от времени облучения в присутствии  $\Sigma\text{АТФ}$ . Видно, что наблюдается значительная инактивация фермента. Полной инактивации фермента соответствовало ковалентное присоединение аналога, равное 1,1—1,2 молям аналога на моль фермента, что было показано методом гель-фильтрации модифицированного белка в условиях разрушения нековалентного комплекса. Ковалентное присоединение [ $^{14}\text{C}$ ]- $\Sigma\text{АТФ}$  к фенилаланил-тРНК-синтетазе было дополнительно показано методом гель-электрофореза модифицированного фермента в денатурирующих условиях. Наблюдали сравнимое мечение  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц фермента, имеющего структуру  $\alpha_2\beta_2$ -типа [4], что находится в согласии с результатами модификации фермента другими реакционно-способными аналогами АТФ [6]. При электрофорезе 10 мкг белка происходило включение 1700 имп/мин и 2200 имп/мин в  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы соответственно, при фоне геля 160 имп/мин.

Для доказательства специфичности присоединения  $\Sigma\text{АТФ}$  к фенилаланил-тРНК-синтетазе были оценены некоторые из характеристик аффинности процесса модификации [7]. На рис. 2 показана зависимость скорости фотоинактивации фермента в реакции аминоацелирования тРНК от концентрации  $\Sigma\text{АТФ}$  в облучаемой смеси. Видно, что зависимость выходит на плато, что может свидетельствовать в пользу образования комплекса фермента с реагентом, предшествующего реакции ковалентного присоединения аналога. Из данных по инактивации, согласно [8], была оценена величина  $K_i$  ( $9 \cdot 10^{-7}$  М) для аналога, оказавшаяся близкой величине  $K_m$ , найденной в реакции аминоацелирования тРНК для АТФ [2]. В то же время добавление специфических суб-

стратов фермента: АТР, фенилаланина, АТР и фенилаланина в условиях образования фенилаланиниладенилата, а также его стабильного аналога — фенилаланиниладенилата, не защищало фермент от инактивации. Наряду с этим АТР частично защищает фермент от ковалентного присоединения [ $^{14}\text{C}$ ]- $\Sigma\text{АТР}$  в процессе облучения. Результаты показаны на рис. 3. Отсутствие защитного эффекта субстратов может быть следствием ряда причин и требует более детального анализа процесса модификации фермента и химического превращения  $\Sigma\text{АТР}$  под действием лазерного облучения.

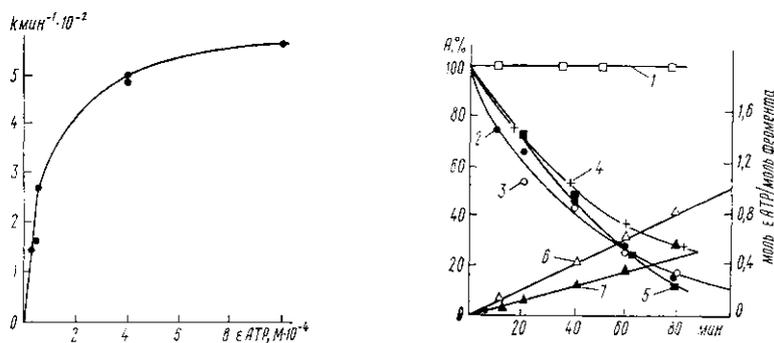


Рис. 2. Зависимость величины  $k_{\text{каж}}$  процесса инактивации фермента от концентрации реагента ( $\Sigma\text{АТР}$ ) в облучаемой смеси.

Fig. 2. Dependence of the  $k_{\text{app}}$  value of the enzyme inactivation process on the  $\Sigma\text{АТР}$  concentration.

Рис. 3. Кинетические кривые инактивации фенилаланил-тРНК-синтетазы при УФ-облучении с  $\Sigma\text{АТР}$  в отсутствие и при добавлении различных специфических лигандов: 1 — в отсутствие  $\Sigma\text{АТР}$ ; 2 — в присутствии  $\Sigma\text{АТР}$  ( $3,5 \cdot 10^{-4}$  М); 3 — в присутствии  $\Sigma\text{АТР}$  ( $3,5 \cdot 10^{-4}$  М) и АТР ( $5 \cdot 10^{-3}$  М); 4 —  $\Sigma\text{АТР}$  ( $3,5 \cdot 10^{-4}$  М) и Phe ( $5 \cdot 10^{-5}$  М); 5 —  $\Sigma\text{АТР}$  ( $3,5 \cdot 10^{-4}$  М) и фенилаланиниладенилат ( $5 \cdot 10^{-6}$  М). Кинетические кривые ковалентного присоединения  $\Sigma\text{АТР}$  ( $3,5 \cdot 10^{-4}$  М) в отсутствие других лигандов (6), в присутствии АТР ( $5 \cdot 10^{-3}$  М) (7).

Fig. 3. Kinetic curves of UV-inactivation of phenylalanyl-tRNA synthetase in the absence and presence of various specific ligands: 1 — without  $\Sigma\text{АТР}$ ; 2 — with  $\Sigma\text{АТР}$  ( $3,5 \times 10^{-4}$  М); 3 — with  $\Sigma\text{АТР}$  ( $3,5 \cdot 10^{-4}$  М) and АТР ( $5 \cdot 10^{-3}$  М); 4 —  $\Sigma\text{АТР}$  ( $3,5 \cdot 10^{-4}$  М) and Phe ( $5 \cdot 10^{-5}$  М); 5 —  $\Sigma\text{АТР}$  ( $3,5 \cdot 10^{-4}$  М) and phenylalaninyladenylate ( $5 \cdot 10^{-6}$  М). Kinetic curves of covalent attachment of  $\Sigma\text{АТР}$  to the enzyme in the absence of other ligands (6), in the presence of АТР ( $5 \cdot 10^{-3}$  М) (7).

В то же время сам факт фотохимического ковалентного присоединения  $\Sigma\text{АТР}$  к белку не вызывает сомнения и в данной работе обнаружен впервые.

Поскольку современные методы химического и ферментативного синтеза позволяют ввести этенонуклеотиды в различные положения рибо- и дезоксирибонуклеиновых кислот, обнаруженная фотохимическая реакция представляет значительный интерес для изучения белок-нуклеиновых взаимодействий. Подобный подход представляется тем более перспективным, что для изучения количественных характеристик комплексообразования белков с этенированными аналогами могут быть использованы методы флуоресцентного титрования.

Авторы признательны С. И. Еременко за помощь в работе с источником излучения, а также К. В. Овсянникову и В. А. Гордиенко за участие в экспериментах.

#### MODIFICATION OF *E. COLI* PHENYLALANYL-tRNA SYNTHETASE BY 1,N<sup>6</sup>-ETHENOADENOSINE-5'-TRIPHOSPHATE

V. N. Podust, G. A. Nevinsky, O. I. Lavrik

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

#### Summary

The irradiation of phenylalanyl-tRNA synthetase by nitrogen laser light ( $\lambda$  337 nm) in the presence of  $\epsilon$  АТР results in enzyme inactivation and covalent attachment of nucleotide to the protein. Dependence of the enzyme photoinactivation rate on the  $\epsilon\text{АТР}$  con-

centration is of saturated character. ATP partially protects the enzyme against covalent attachment of  $\epsilon$ ATP. However none of the specific ligands (ATP, Phe, phenylalanylalanyl) prevents the enzyme inactivation.

1. Иванов М. В., Кост А. А. Исследование белков с помощью этенопроизводных аденина и цитозина.— Успехи биол. химии, 1980, 21, с. 112—129.
2. Фенилаланил-тРНК-синтетазы *E. coli*. Модификация фермента флюоресцентными химически активными аналогами нуклеотидов / Г. А. Невинский, В. Н. Подуст, В. Н. Анкилова, О. И. Лаврик.— Биоорганическая химия, 1983, 9, № 7, с. 936—946.
3. 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.— Молекулярная биология, 1984, 18, № 5, с. 1311—1315.
4. Анкилова В. Н., Лаврик О. И., Ходырева С. Н. Очистка и некоторые свойства фенилаланил-тРНК-синтетазы из *E. coli* MRE-600.— Прикладная биохимия и микробиология, 1984, 20, № 2, с. 208—216.
5. Применение сорбиции на аминоэтилцеллюлозе для выделения тРНК из водного слоя после фенольной экстракции / Л. С. Сандахчиев, В. К. Старостина, Л. Е. Стефанович, В. М. Чучаев.— Молекулярная биология, 1967, 1, № 4, с. 463—466.
6. Модификация фенилаланил-тРНК-синтетазы из *E. coli* аденозин-5'-триметафосфатом / С. Н. Ходырева, Г. А. Невинский, В. Н. Анкилова, О. И. Лаврик.— Там же, 1983, 17, № 6, с. 1196—1203.
7. Аффинная модификация биополимеров / В. В. Власов, М. А. Грачев, О. И. Лаврик и др.— Новосибирск: Наука, 1983.—244 с.
8. Kitz R., Wilson I. B. Esters methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase.— J. Biol. Chem., 1962, 247, N 10, p. 3245—3249.

Ин-т биоорганической химии СО АН СССР, Новосибирск

Получено 01.04.85

## О НОВОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ СТАНДАРТЕ

Постановлением Госстандарта от 27.02.84 утвержден разработанный впервые ГОСТ 7.46—84 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Справочное издание. Представление численных данных о свойствах веществ и материалов. Общие требования». Срок его действия установлен с 01.01.85 до 01.01.88.

Цель разработки стандарта — унификация требований к представлению численных данных о свойствах веществ и материалов в справочных изданиях.

Стандарт соответствует Рекомендациям по представлению в первичной литературе численных экспериментальных данных Международного комитета по сбору и оценке численных данных для науки и техники (КОДАТА), ГОСТ 7.32—81 и ГОСТ 7.33—81. Стандарт устанавливает общие требования к структуре справочного издания с численными данными о свойствах веществ и материалов, представлению в нем численных данных и порядку согласования выпуска справочного издания. Справочное издание должно обеспечивать ученых и специалистов достоверной, полной и современной информацией о численных данных свойств веществ и материалов, иметь четко выраженный читательский адрес и указания на достоверность или категорию представленных численных данных — по ГОСТ 8.310—78, содержать записи численных данных в форме, удобной для обработки и ввода в ЭВМ, включать поисковый аппарат, обеспечивающий удобство пользования изданием.

Всесоюзный научно-исследовательский центр по материалам и веществам Госстандарта (ВНИЦ МВ) организует экспертизу содержания справочника и выдает издательству право титульной записи «Согласовано с Государственной службой стандартных справочных данных».