

**ВЫДЕЛЕНИЕ И КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ РИБОСОМНОГО БЕЛКА TS9**

Описан метод выделения и кристаллизации рибосомного белка TS9 из экстремально термофильной бактерии *Thermus thermophilus*. Кристаллы имеют ромбическую форму и максимальный размер 0,5 мкм.

**Введение.** Выяснение деталей пространственного строения рибосомы невозможно без применения метода рентгеноструктурного анализа и, следовательно, без выращивания монокристаллов рибосом как первого этапа кристаллографического исследования. Путь, дополняющий исследование структуры целых рибосом, заключается в разборке рибосом и кристаллизации компонентов, их составляющих, например рибосомных белков. В последнее время достигнут некоторый прогресс в этой области исследований, чему во многом способствовало внедрение в практику термофильных микроорганизмов в качестве источника для получения препаратов. К настоящему моменту получены кристаллы ряда рибосомных белков, в основном, из термофильных бактерий [1—4]. Для одного из них — белка L30 из большой рибосомной 50S субчастицы *Bacillus stearothermophilus* — была определена структура с высоким разрешением [5]. В то же время пока нет никаких структурных данных (даже низкого разрешения) для белков из малой рибосомной 30S субчастицы.

Недавно в нашей группе были получены кристаллы 30S субчастицы из экстремально термофильного микроорганизма *Thermus thermophilus* [6]. Это стимулировало нас к работе по выделению и кристаллизации индивидуальных рибосомных белков из этого же объекта. Данная статья посвящена выделению и кристаллизации рибосомного белка TS9 (по номенклатуре, приведенной в работе [7]) из рибосомной 30S субчастицы *Th. thermophilus*.

**Материалы и методы.** Выращивание бактериальной массы, выделение рибосом и рибосомных 30S субчастиц проводили, как описано в работе [7]. Производные 30S субчастиц — так называемые «коровые» частицы (содержащие около половины рибосомных белков) — получали инкубацией исходных 30S субчастиц в 0,02 М трис-НСI-буфере, рН<sub>20°C</sub> 7,5, 3,5 М LiCl и 0,1 М MgCl<sub>2</sub> в течение 20 ч на холоду. Коровые частицы отделяли от экстрагированного белка центрифугированием при 45000 об/мин в течение 6 ч, осадок растворяли в 0,02 М трис-НСI-буфере, содержащем 0,05 М MgCl<sub>2</sub> и 0,15 М NH<sub>4</sub>Cl, а затем добавляли концентрированные растворы LiCl и MgCl<sub>2</sub> до конечной концентрации 6 и 0,1 М соответственно и дальнейшую экстракцию белка проводили в течение 20 ч на холоду. Выпавший при этом осадок РНК отделяли от экстрагированного белка центрифугированием при 16000 об/мин в течение часа. Полученную белковую смесь переводили в буфер, содержащий 0,05 М Na-ацетат, рН 5,6, и 0,05 М NaCl, с помощью хроматографии на сефадексе G-25 и наносили на колонку с CM-Тоуорепарl 650S («Тоуо-Soda», Япония), уравновешенную этим же буфером. Интересующий нас белок TS9 оказался в «проскоке», в то время как остальные белки задерживались на колонке. От единственной примеси — полипептида с молекулярной массой порядка 60000 (по данным DS-Na-электрофореза), возможно, нерибосомной породы — белок TS9 отделяли пропусканием через колонку с ДЭАЭ-Тоуорепарl 650S («Тоуо-Soda»), уравновешенную тем же буфером. Как и в первом случае, белок TS9 не адсорбировался на колонке. «Проскок» с колонки собирали, концентрировали и использовали в экспериментах по кристаллизации.

Кристаллизацию проводили методом диффузии паров в «висящей» капле, используя в качестве осадителя 2-метил-2,4-пентандиол (МПД).

Идентификацию белка проводили двухмерным электрофорезом [8], чистоту оценивали с помощью DS-Na-электрофореза в 15 %-ном полиакриламидном геле [9].

**Результаты и обсуждение.** Описанная выше процедура выделения белка TS9 является составным звеном общей методики выделения индивидуальных рибосомных белков из 30S субчастиц *Th. thermophilus*,

разрабатываемой в данное время. Экстракцию белков проводили в два этапа. Первый — обработка 30S субчастиц 3,5 М LiCl, второй — обработка полученных после первого этапа коровых частиц 6 М LiCl. Таким образом получали две фракции рибосомных белков, примерно равные по количеству входящих в них индивидуальных белков. Далее каждая фракция подвергалась хроматографическому разделению на

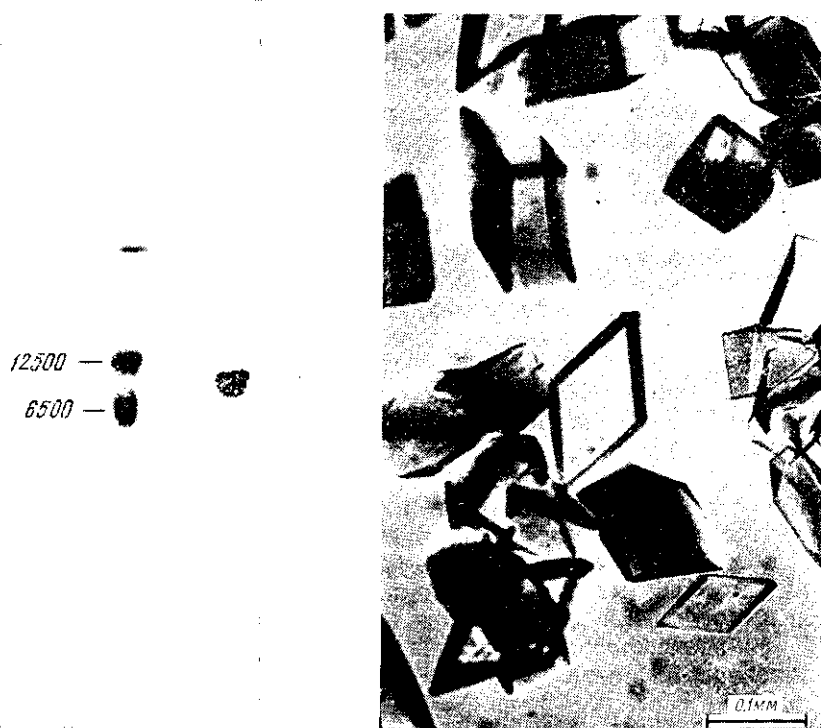


Рис. 1. Электрофоретический анализ растворенных кристаллов белка *TS9* (справа). Слева — стандарты молекулярной массы

Fig. 1. Electrophoretic analysis of dissolved protein *TS9* crystals (right). Markers are shown on the left

Рис. 2. Микрофотография кристаллов белка *TS9*

Fig. 2. Microphotographs of protein *TS9* crystals

СМ-Тоуреарл 650S. Следует отметить отсутствие денатурирующих агентов на всех этапах выделения белков, что может играть немаловажную роль в экспериментах по кристаллизации.

Один из полученных белков *TS9* удалось закристаллизовать. Это кислый белок (по оценке его местоположения на двухмерной электрофореграмме [7]) с молекулярной массой примерно 9000—11 000 по данным DS-Na-электрофореза (рис. 1). Исходя только из имеющихся характеристик, весьма трудно предположить, аналогом какого белка из рибосом *Escherichia coli* он является. Лишь с большой осторожностью можно допустить, что белок *TS9* — аналог белка *S6 E. coli*.

Кристаллизацию проводили при комнатной температуре из раствора белка с концентрацией 8—12 мг/мл, содержащего 0,05 М трис-HCl, pH 7,5, и 0,15 М NaCl. В качестве осадителя использовали 20—25 %-ный МПД. Кристаллы, имеющие ромбическую форму, образовывались в течение 2—3 сут, достигая при этом максимального размера 0,5 мм (рис. 2). В настоящее время проводится предварительное кристаллографическое исследование.

Авторы благодарят М. Б. Гарбер, С. Д. Траханова, М. М. Юсупова за полезные советы и помощь при выполнении работы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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. Appelt K., White S. W., Wilson K. S. Proteins of the *Bacillus stearothermophilus* ribosome. Crystallization of proteins L30 and S5 // Ibid.—1983.—258, N 21.—P. 13328—13330.
3. Liljas A., Mewcower M. E. Purification and crystallization of a protein complex from *Bacillus stearothermophilus* ribosomes // J. Mol. Biol.—1981.—153, N 2.—P. 393—398.
4. Седелъникова С. Э. Выделение индивидуальных белков из 50S субчастицы рибосом *Thermus thermophilus*. Кристаллизация белка TL7. // Биополимеры и клетка.—1987.—3, № 3.—С. 163—166.
5. Crystall structure of a prokaryotic ribosomal protein / K. S. Wilson, K. Appelt, S. Badger et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 19.—P. 7251—7255.
6. Кристаллизация 30S субчастиц рибосом *Thermus thermophilus* / М. М. Юсупов, С. Д. Траханов, В. В. Барынин и др. // Докл. АН СССР.—1987.—292, № 5.—С. 1271—1274.
7. Гогия З. 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.
8. Kenny G., 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 sulphate gel electrophoresis // Meth. Enzymol.—1979.—59.—P. 534—550.
9. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227, N 5259.—P. 680—685.

Ин-т белка АН СССР, Пущино

Получено 09.06.88

## ISOLATION AND CRYSTALLIZATION OF RIBOSOMAL PROTEIN TS9

S. Ch. Agalarov, I. A. Eliseikina

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

### Summary

A method is suggested to isolate ribosomal protein TS9 from 30S subparticles of ribosomes from extremal-thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*. Rhomb-shaped crystals of this protein with maximal dimensions of 0.5 mm have been obtained. A method of vapour diffusion in a «hanging» drop with 2-methyl-2,4-pentanediol (MPD) as a precipitant has been used for crystallization.

УДК 577.323

Ю. С. Бабаян

## СВЯЗЫВАНИЕ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ С ПОЛИРИБОГУАНИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ

Исследовано связывание бромистого этидия (БЭ) с полирибогуаниловой кислотой по характеру изменения спектров поглощения. Расчеты показали, что стехиометрия насыщения составляет одну молекулу БЭ на пять гуанинов с константой связывания  $(5,2 \pm \pm 0,8) \cdot 10^4 M^{-1}$  при  $0,1 M NaCl$  и комнатной температуре.

**Введение.** Взаимодействие бромистого этидия (БЭ) с нуклеиновыми кислотами исследовано довольно хорошо [1—6]. В частности, было показано, что в физиологических условиях взаимодействие носит интеркалирующий характер [1—3], причем стехиометрия насыщения составляет одну молекулу БЭ на две пары оснований [1, 2, 4, 6]. Характер связывания слабо зависит от GC-содержания для ДНК [1] и очень сильно — для двуспиральных РНК [6].