

## Виділення і очищення ізоакцепторних форм тРНК<sub>1</sub><sup>Ser</sup> і тРНК<sub>2</sub><sup>Ser</sup> із *Thermus thermophilus*

І. А. Крикливий, О. П. Коваленко, О. Й. Гудзера, Г. Д. Яремчук, М. А. Тукало

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ 03143, Україна

mtukalo@imbg.org.ua

*Серинова аміноацилювальна система є унікальною в тому розумінні, що це єдина система, де синтетаза 2-го структурного класу впізнає тРНК з довгою варіабельною гілкою (тРНК 2-го типу), що становить особливий інтерес для вивчення механізмів упізнавання тРНК відповідною аміноацил-тРНК синтетазою. Викладено методичні підходи до отримання високоочищених ізоакцепторних тРНК<sub>1</sub><sup>Ser</sup> і тРНК<sub>2</sub><sup>Ser</sup> з екстремального термофіла *T. thermophilus* у міліграмових кількостях, необхідних для структурних досліджень. Розроблений метод очищення тРНК<sup>Ser</sup> включає хроматографію на бензоільованій ДЕАЕ-целюлозі і високоєфективну рідинну хроматографію на аніонообмінній колонці Spherogel TSK DEAE SPW та оберненофазовій колоці Ultrapore C8 з використанням обладнання HPLC.*

*Ключові слова: тРНК, хроматографія, високоєфективна рідинна хроматографія, екстремальний термофіл *Thermus thermophilus*, бензоільована ДЕАЕ-целюлоза.*

**Вступ.** Правильне включення амінокислоти серину, якій відповідають шість кодонів, у білкову молекулу відповідно до генетичного коду забезпечує серинова аміноацилювальна система (СерРС і тРНК<sup>Ser</sup>). Характерними рисами зазначеної системи є те, що серил-тРНК синтетаза є однією з трьох АРСаз, які не впізнають антикодон тРНК у прокариотів. Крім того, тРНК<sup>Ser</sup> має довгу варіабельну гілку, що суттєво відрізняє цю систему від більшості інших.

Серил-тРНК синтетаза за своїми структурно-функціональними характеристиками належить до 2-го структурного класу [1, 2]. Механізми взаємодії ферментів з гомологічними тРНК мають корінні відмінності для АРСаз 1-го та 2-го структурних класів. тРНК<sup>Ser</sup>, як і тРНК<sup>Leu</sup> та тРНК<sup>Tyr</sup> прокариотів, має довгу варіабельну гілку і належить до другого структурного типу [3]. Довжина

варіабельної гілки тРНК 2-го типу може сягати 20 нуклеотидів замість 4–5 у тРНК 1-го типу. З наявністю довгої варіабельної гілки пов'язані суттєві перешкоди при вивченні просторової структури тРНК 2-го типу. Якщо тРНК<sup>Phe</sup> (1-й тип) була однією з перших біологічних макромолекул, просторову структуру якої вивчено методом рентгено-структурного аналізу [4], то й донині не вдалося отримати кристали вільної тРНК з довгою варіабельною гілкою, які б дали змогу визначити її просторову будову. Таким чином, серинова аміноацилювальна система є унікальною в тому розумінні, що це єдина система, де синтетаза 2-го структурного класу впізнає тРНК 2-го типу. Саме тому з'ясування механізмів упізнавання тРНК<sup>Ser</sup> серил-тРНК синтетазою та її ацилювання становлять особливий інтерес.

Наші дослідження взаємодії тРНК, які мають довгу варіабельну гілку, з гомологічними синтетазами (тРНК<sup>Ser</sup> і тРНК<sup>Leu</sup> з печінки бика і молочної

залози корів відповідно) методами хімічної модифікації у розчині [5—10] дозволили отримати важливу інформацію, яка свідчить про те, що ці тРНК повинні відрізнятися як за своїми просторовими структурами, так і їхніми орієнтаціями відносно ферментів. Однак для з'ясування механізмів їхнього функціонування як головної ланки реалізації генетичного коду в клітинах живих організмів необхідне глибоке вивчення просторових структур тРНК і їхніх комплексів з гомологічними аміноацил-тРНК синтетазами методами рентгеноструктурного аналізу.

Успішне використання методів рентгеноструктурного аналізу залежить від якості кристалів. Кристали повинні бути добре спакованими і стійкими до рентгенівських променів, тому що експериментальна експозиція може тривати протягом кількох годин. Отже, для вирощування кристалів біомакромолекул і їхніх комплексів потрібні препарати найвищого ступеня чистоти. Будь-які домішки будуть збурювати кристалічну структуру і знижувати роздільну здатність методу.

На даний час ми володіємо потужним арсеналом високоефективних методів (хроматографія у різних варіантах, електрофорез, седиментація тощо), застосування яких, на перший погляд, може легко вирішувати проблеми отримання препаратів індивідуальних біомакромолекул високого ступеня чистоти. Однак специфічною особливістю транспортних РНК є те, що вони мають однотипну просторову структуру (L-форма), яка обумовлює їхню схожу поведінку при взаємодії з різними хроматографічними носіями. Вміст тРНК<sup>Ser</sup> у загальному пулі тРНК складає ~2 %, але в структурному відношенні вона надзвичайно гетерогенна. Ця гетерогенність обумовлена як виродженістю генетичного коду (6 антикодонів), так і ступенем дозрівання (посттранскрипційна модифікація нуклеотидних основ і перетворення їх на мінорні компоненти). Крім того, макромолекули з однаковою первинною структурою можуть мати різні конфорації. Усі такі різноманітні форми тРНК<sup>Ser</sup> впізнає серил-тРНК синтетаза і може формувати з ними комплекси у процесі кристалізації. Утворені кристали матимуть високу розрихленість і будуть неоднорідними та недоступними для аналізу. Нами виділено препарати тРНК<sup>Ser</sup> печінки бика, достатньо очищені (понад 90 %) від інших тРНК з використанням лише двох хроматографічних стадій на бензоїльованій ДЕАЕ-целюлозі (за присутності і

відсутності Mg<sup>2+</sup>) [11], але вони мали значну структурну гетерогенність і були безперспективними в експериментах з кристалізацією. Отже, при виділенні і очищенні тРНК нам було варто ретельніше відбирати макромолекули тРНК<sup>Ser</sup>, ніж це здійснює сама серил-тРНК синтетаза.

Об'єктом структурних досліджень обрано серинову аміноацилювальну систему з екстремального термофіла *T. thermophilus*. Ці мікроорганізми поширені у гарячих джерелах з температурою 65—80 °С, тому ймовірно, що їхні макромолекули повинні мати структурні особливості, які забезпечують їм вищу стійкість до зовнішніх впливів і кращу придатність для структурних досліджень.

У даній роботі викладено методичні підходи, які дозволили виділити препарати високої чистоти двох ізоакцепторних форм тРНК<sup>Ser</sup> у кількостях, достатніх для вивчення їхніх первинних структур, фізико-хімічних і функціональних властивостей, отримання кристалів комплексів тРНК<sup>Ser</sup> з гомологічною СерРС і побудови моделей просторових структур комплексів на основі експериментальних даних рентгеноструктурного аналізу.

**Матеріали і методи.** У роботі використано бензоїльовану ДЕАЕ-целюлозу (БД-целюлоза) («Serva», Німеччина), NaCl, MgCl<sub>2</sub> («Fisher», США), трис, фенілметилсульфонілфторид («Calbiochem», США), ацетат амонію «осч», 2-меркаптоетанол («Merk», Німеччина), фільтри GF/C, діетиламіноетилцелюлозу («Whatman», Англія), ізопропіловий спирт «осч», <sup>14</sup>C-серин (120 Ки/моль) (Інститут із дослідження, виробництва і використання радіоактивних ізотопів, Чехія). Всі інші реагенти мали кваліфікацію «осч» і «хч». Розчини готували на основі бідистильованої води. Для експериментів використано: центрифугу K-70 (Німеччина), спектрофотометр «Specord UVVIS» (Німеччина), хроматографічне обладнання фірми «Gold-System» і високоефективні хроматографічні колонки Spherogel TSK ДЕАЕ 5PW, Ultrapore C-3, Ultrapore C-8 («Beckman», США), сцинтиляційний лічильник Rackbeta («LKB», Швеція).

Клітини бактерій *T. thermophilus* штаму НВ8 або НВ27 вирощували у ферментері об'ємом 300 л за температури 75 °С у поживному середовищі, яке містило: 5 г/л поліпептону, 2 г/л дріжджового екстракту і 2 г/л NaCl. Ріст культури контролювали за зростанням поглинання при A<sub>590</sub> до величини 1,8.

Клітини збирали за допомогою центрифугуван-

ня, відмивали від залишків поживного середовища, заморожували і зберігали до використання.

Препарати сумарної тРНК із *T. thermophilus* готували методом, який поєднує фенольну екстракцію РНК із бактеріальних клітин і депротейнізацію сумішами фенол:хлороформ (1:1) та хлороформ:ізоаміловий спирт (9:1). Фази розділяли на центрифугі К-70. Для очищення тРНК від білків і домішок нуклеотидної і полісахаридної природи використовували ДЕАЕ-целюлозу. У кінцевому супернатанті величину рН доводили додаванням сухого трису до 7,5, наносили його на ДЕАЕ-целюлозу у лабораторній скляниці, перемішували склянкою паличкою і вміщували в холодильник для утворення осаду (операцію повторювали кілька разів). Після зв'язування РНК ДЕАЕ-целюлозу відмивали 0,14 М NaCl у трис-НСl буфері, рН 7,5. Відміту масу вносили в хроматографічну колонку і відмивали 0,3 М NaCl для видалення білкових домішок. тРНК елюювали 1 М NaCl і осаджували із розчину додаванням 2,5 об'єму етилового спирту за присутності 2 % ацетату натрію. Осад, який формувався протягом 17–20 год за температури 4 °С, збирали за допомогою центрифуги К-70.

Фермент для тестування тРНК у процесі очищення виділяли з тієї ж біомаси, що й тРНК. Клітини збирали центрифугуванням, відмивали від залишків поживного середовища і руйнували за допомогою French Press у 40 мМ трис-НСl буфері, рН 7,9, який містив 2 мМ дитіотреїтол, 0,1 мМ ЕДТА, 1 мМ фенілметилсульфоніл фторид, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ NaN<sub>3</sub>. Одержаний екстракт центрифугували впродовж 2 год при 105 000 g і супернатант наносили на колонку з ДЕАЕ-целюлозою, урівноважену 20 мМ трис-НСl буфером, рН 7,8, який містив 0,2 мМ дитіотреїтол, 0,1 мМ ЕДТА, 0,1 мМ фенілметилсульфоніл фторид, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ NaN<sub>3</sub>. Колонку відмивали посадковим буфером і елюювали білок 0,3 М NaCl у тому ж буфері. Отриманий розчин білка використовували як сумарний фермент у реакціях аміноацилювання.

Акцепторну активність препаратів на різних стадіях виділення визначали за максимальним рівнем утворення аміноацил-тРНК у реакції аміноацилювання з використанням <sup>14</sup>С-серину та сумарного препарату аміноацил-тРНК синтетази. Стандартна реакційна суміш об'ємом 0,25 мл містила: 0,1 мМ трис-НСl, рН 7,6, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ АТФ, 5–15 мМ <sup>14</sup>С-серин і 1 мг/мл сумарного препарату АРСази *T. thermophilus*. Із досліджу-

ваних фракцій відбирали по 50 мкл розчину тРНК, вносили 200 мкл реакційної суміші і інкубували протягом 7 хв за температури 65 °С. Реакцію зупиняли, додаючи 500 мкл охолодженого 10 %-го розчину трихлороцтової кислоти. Включення <sup>14</sup>С-серину до аміноацил-тРНК визначали сцинтиляційним лічильником.

Препарати індивідуальних тРНК виділяли, використовуючи декілька хроматографічних стадій на колонках з БД-целюлозою, Spherogel TSK DEAE 5PW та Ultrapore C-3, Ultrapore C-8 фірми «Beckman» (США) та обладнання для високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) «Gold System» («Beckman»). Після кожної хроматографічної стадії визначали фракції, активні у реакції аміноацилювання, об'єднували їх, осаджували етанолом і використовували для подальшого очищення.

Результати і обговорення. На першому етапі виділення препаратів індивідуальних тРНК<sub>1</sub><sup>Ser</sup> і тРНК<sub>2</sub><sup>Ser</sup> використано запропоновану Генером [12] хроматографію на колонці з бензоїльованою ДЕАЕ-целюлозою. Хроматографію здійснювали, як описано раніше [13]. Транспортну РНК, активну у реакції аміноацилювання серином, виявлено лише у фракціях, які елюювали розчинами 1,5 М NaCl та 10 %-го етилового спирту. Відібрані фракції об'єднували, осаджували етанолом, висушували і зберігали у морозильнику до подальшого використання. Втрати тРНК на цій колонці становили близько 20 %. Фракції, які містили серинову активність, становили близько 10 % матеріалу, елюйованого з колонки.

Подальше очищення виконували хроматографуванням на аніонообмінній колонці високого тиску Spherogel TSK DEAE 5PW (2,1 × 15 см) з використанням обладнання для ВЕРХ («Gold System»). Хроматографію здійснювали з використанням таких буферних розчинів: буфер А містив 0,05 М трис-НСl, рН 7,5, 0,2 М NaCl, 0,01 М MgCl<sub>2</sub> і 10 %-й 2-ізопропанол; буфер Б відрізнявся вмістом NaCl — 1,0 М. Після нанесення тРНК колонку відмивали буфером А, потім протягом 5 хв лінійно збільшували частку буфера Б до 11 % і далі елюювали градієнтом концентрації буфера Б, який формували за кривою № 4, запрограмованою у «Gold System», збільшуючи вміст буфера Б до 25 % протягом 60 хв. Швидкість елюювання — 5 мл/хв за кімнатної температури (20–25 °С). Варто зазначити, що хроматографування на колонці ДЕАЕ 5PW за температури, нижчої від 20 °С,

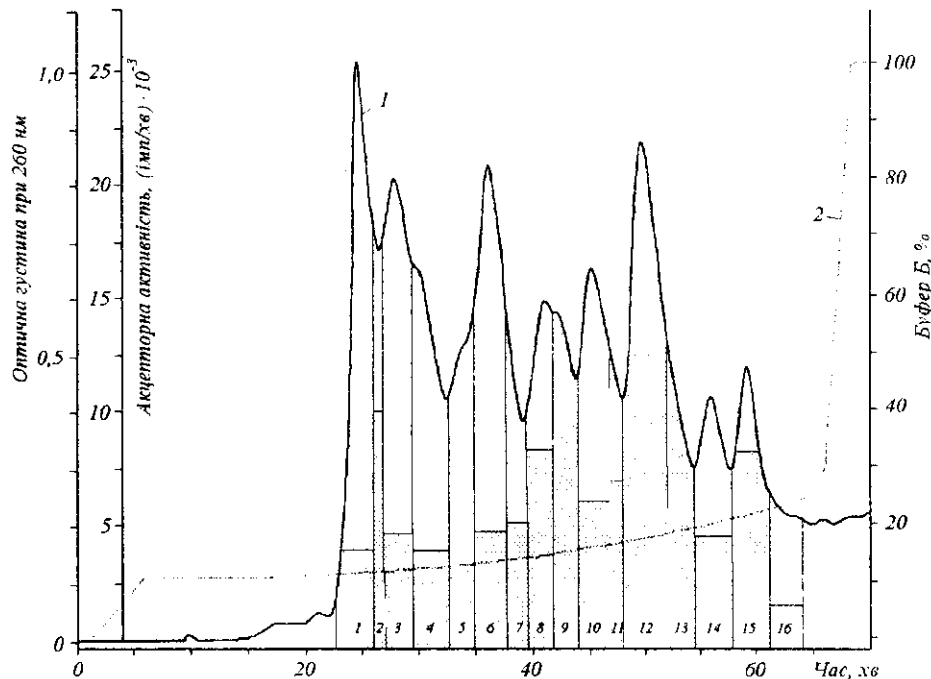


Рис. 1. Розділення серинових тРНК із *Thermus thermophilus* хроматографуванням на вискоєфективній аніонообмінній колонці Spherogel TSK DEAE 5PW: 1 — оптична густина при 260 нм; 2 — градієнт концентрації буфера Б. Зафарбована область відображає рівень активності тРНК<sup>Ser</sup> фракцій 1—16 у реакції аміноацилювання

дає гірше розділення. У процесі хроматографії відбирали фракції, які потім досліджували на вміст тРНК<sup>Ser</sup>. На рис. 1 наведено типову хроматограму, з якої можна бачити, що тРНК<sup>Ser</sup> виходить чотирма досить добре розділеними піками. Для подальшого виділення індивідуальних тРНК<sup>Ser</sup> відбирали групи фракцій 8, 9 і 12, 13. У фракціях 8, 9 містилась тРНК<sub>2</sub><sup>Ser</sup> з чистотою близько 50 %, а тРНК<sub>1</sub><sup>Ser</sup> була зосереджена у фракціях 12, 13 і мала чистоту понад 65 %. Інші фракції для подальшого очищення не використовували. Кількість тРНК<sup>Ser</sup> у цих фракціях значно менша і вони мали чистоту 10—20 %.

Останню хроматографію тРНК<sup>Ser</sup> здійснювали на колонці високого тиску Ultrapore C8 (1 × 20 см) з використанням «Gold System». При підборі умов хроматографування використано колонки Ultrapore C3 і Ultrapore C8 та низку компонентів для створення буферних систем (фосфатний буфер, формиат натрію, сульфат амонію і органічні розчинники — метанол, 2-пропанол). У підсумку ми зупинили свій вибір на колонці C8. Буфер А містив 0,05 М ацетат амонію і 0,01 М MgCl<sub>2</sub>; буфер Б — 10 %-й 2-ізопропанол. Градієнт формували, як і в разі хроматографії на колонці Spherogel TSK DEAE 5PW (рис. 2, 3). Швидкість елюювання 4 мл/хв за кімнатної температури (20—25 °С). Потрібно зау-

важити, що хроматографія на оберненофазових колонках Ultrapore C3 і Ultrapore C8 ще більшою мірою залежить від температурних умов, ніж при застосуванні Spherogel TSK DEAE 5PW, і при зниженні температури до 15 °С використання цих колонок малоефективне. В результаті хроматографії одержаних на колонці Spherogel TSK DEAE 5PW фракцій 8, 9 і 12, 13 виділено індивідуальні тРНК<sub>1</sub><sup>Ser</sup> (рис. 2) і тРНК<sub>2</sub><sup>Ser</sup> (рис. 3) з рівнем очищення понад 95 %. Високу чистоту отриманих препаратів тРНК<sub>1</sub><sup>Ser</sup> і тРНК<sub>2</sub><sup>Ser</sup> підтверджено в експериментах з визначення їхніх первинних структур. Варто зазначити, що якщо на першому етапі на колонку з БД-целюлозою наносили 4—4,5 г сумарного препарату тРНК, то в результаті ми одержували 3—3,5 мг тРНК<sub>1</sub><sup>Ser</sup> і 2—2,5 мг тРНК<sub>2</sub><sup>Ser</sup>. Тобто отримання препаратів біомакромолекул високого ступеня чистоти є дуже трудомістким процесом, з великими втратами матеріалу на різних стадіях очищення, проте в іншому разі не можна визначити їхні структурно-функціональні характеристики та, що найголовніше, — виконати структурні дослідження.

Вивчення первинних структур одержаних тРНК<sub>1</sub><sup>Ser</sup> і тРНК<sub>2</sub><sup>Ser</sup> (рис. 4) показало, що вони відрізняються за нуклеотидними послідовностями і найбільші розбіжності стосуються ділянок антико-

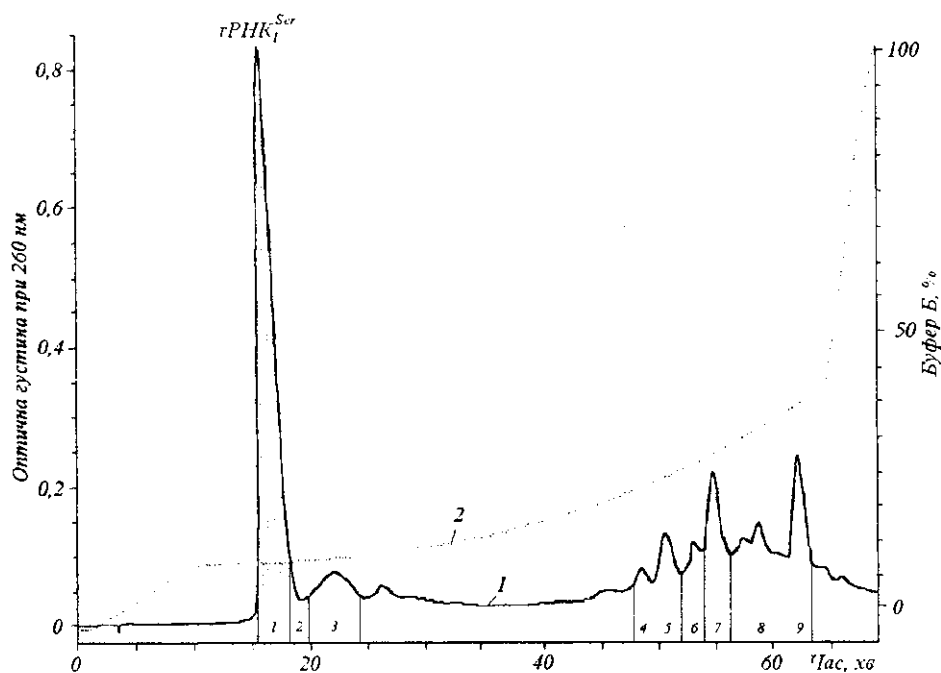


Рис. 2. Очищення ізоакцепторної  $tRNA_1^{Ser}$  із *Thermus thermophilus* на оберненофазовій колонці Ultrapore C8: 1 — оптична густина при 260 нм; 2 — градієнт концентрації буфера Б. Зафарбований пік містить  $tRNA_1^{Ser}$  чистотою близько 1600 пмоль/1  $A_{260}$

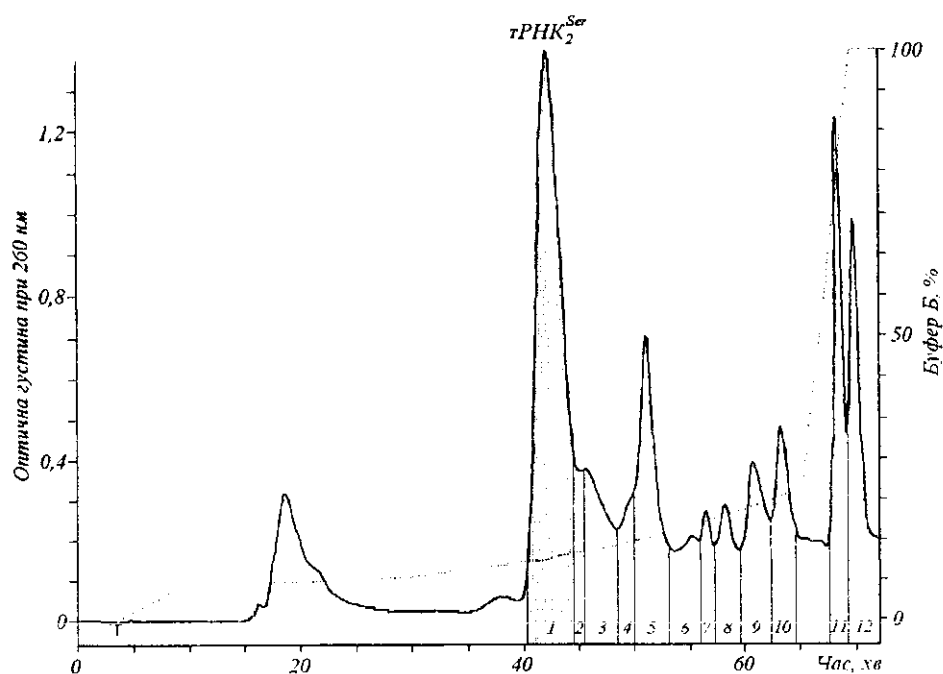


Рис. 3. Очищення ізоакцепторної  $tRNA_2^{Ser}$  із *Thermus thermophilus* на оберненофазовій колонці Ultrapore C8: 1 — оптична густина при 260 нм; 2 — градієнт концентрації буфера Б. Зафарбований пік містить  $tRNA_2^{Ser}$  чистотою близько 1570 пмоль/1  $A_{260}$

донового стебла, варіабельної гілки та антикодонової петлі. Вони мають також різну довжину варіабельних гілок — у  $tRNA_1^{Ser}$  19 нуклеотидів, у  $tRNA_2^{Ser}$  — 20 [14]. Потрібно відзначити, що структурні відмінності цих ізоакцепторних  $tRNA^{Ser}$  зосе-

реджені у ділянках, які є найімовірнішими кандидатами на взаємодію з носіями і зумовлюють різну хроматографічну поведінку та розділення. Обидві  $tRNA$  використано також для одержання кристалів комплексів із гомологічною СерРС [15]. Отримані



формілування еукаріотних ініціаторних тРНК. У результаті хроматографії на колонці Nucleosil C4 та демодифікації і повторної хроматографії на тій самій колонці отримано тРНК<sub>1</sub><sup>Met</sup> з чистотою 1700 пмоль/1 A<sub>260</sub>.

Таким чином, запропоновані підходи розширюють можливості виділення високоочищених препаратів тРНК потрібної специфічності. Однак їх не можна використовувати у випадках одержання в чистому вигляді ізоакцепторних форм тРНК. Крім того, використання ферментів для модифікації завжди пов'язано з ризиком, що вони містять домішки нуклеаз, які можуть змінювати структуру тРНК.

Розроблена нами методика очищення ізоакцепторних форм тРНК<sup>Ser</sup> із *T. thermophilus* дозволяє одержувати препарати високої чистоти, цілком придатні для структурних досліджень. Єдиним недоліком цього методу є значні втрати матеріалу на різних етапах очищення і низький вихід кінцевого продукту.

I. A. Krikliiviy, O. P. Kovalenko, O. Y. Gudzera, A. D. Yaremchuk, M. A. Tukalo

Isolation and purification isoaccepting tRNA<sub>1</sub><sup>Ser</sup> and tRNA<sub>2</sub><sup>Ser</sup> from *Thermus thermophilus*

#### Summary

Serine aminoacylation system is unique as it is the only system where synthetase of class II recognizes tRNA with a long variable stem (type II tRNA) which is of great interest to study the mechanisms of tRNA recognition by corresponding aminoacyl-tRNA synthetase. Current paper presents the methodological approaches for obtaining purified isoacceptor tRNA<sub>1</sub><sup>Ser</sup> and tRNA<sub>2</sub><sup>Ser</sup> in milligram quantities from extremal thermophil *T. thermophilus* for crystallography. The developed method of tRNA<sup>Ser</sup> purification employs the chromatography on benzoylated diethylaminoethyl-cellulose and high-performance liquid chromatography on anion-exchange column Spherogel TSK DEAE SPW, and reverse phase column Ultrapore C8 using HPLC equipment (Beckman).

Keywords: tRNA, chromatography, high-performance liquid chromatography, extremal thermophil *Thermus thermophilus*, benzoylated diethylaminoethylcellulose.

I. A. Krikliiviy, O. P. Kovalenko, O. Y. Gudzera, A. D. Yaremchuk, M. A. Tukalo

Выделение и очистка изоакцепторных форм тРНК<sub>1</sub><sup>Ser</sup> и тРНК<sub>2</sub><sup>Ser</sup> из *Thermus thermophilus*

#### Резюме

Сериновая аминокотилюющая система является уникальной в том понимании, что это единственная система, в которой синтетаза 2-го структурного класса узнает тРНК с длинной вариабельной ветвью (тРНК 2-го типа), что вызывает осо-

бий интерес при изучении механизмов узнавания тРНК соответствующей аминокотил-тРНК синтетазой. Изложены методические подходы к получению методами хроматографии высокоочищенных изоакцепторных тРНК<sub>1</sub><sup>Ser</sup> и тРНК<sub>2</sub><sup>Ser</sup> из экстремального термофила *T. thermophilus* в миллиграммовых количествах, необходимых для структурных исследований. Разработанный метод очистки тРНК<sup>Ser</sup> включает хроматографию на бензоилированной ДЭАЭ-целлюлозе, высокоэффективную жидкостную хроматографию на анионообменной колонке Spherogel TSK DEAE SPW и обратнотазовой колонке Ultrapore C8 с использованием оборудования HPLC.

Ключевые слова: тРНК, хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, экстремальный термофил *Thermus thermophilus*, бензоилированная ДЭАЭ-целлюлоза.

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Eriani G., Delarue M., Poch O., Gangloff J., Moras D. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs // Nature.—1990.—347.—P. 203—206.
2. Cusack S., Berthet-Colominas C., Hartlein M., Nassar N., Leberman R. A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase at 2.5 Å // Nature.—1990.—347.—P. 249—255.
3. Sprinzl M. M., Dank N., Nock S., Schon A. Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes // Nucl. Acids Res.—1991.—19, Suppl.—P. 2127—2171.
4. Kim S.-H., Quigley G. J., Suddath F. L., McPherson A., Sneden D., Kim J.-J., Weinzierl J., Rich A. Three-dimensional structure of yeast phenylalanine transfer RNA: folding of the polynucleotide chain // Science.—1973.—179.—P. 285—288.
5. Петрушенко З. М., Крикливий І. А., Тукало М. А., Мацука Г. Х. Состояние вариабельного стебля тРНК<sup>Leu</sup> молочной железы коров в растворе // Докл. АН УССР, сер. Б.—1986.—№ 10.—С. 75—77.
6. Петрушенко З. М., Тукало М. А., Мацука Г. Х. Определение остатков фосфорной кислоты, участвующих в образовании пространственной структуры тРНК<sup>Leu</sup> молочной железы коров // Биоорг. химия.—1986.—12, № 11.—С. 1492—1497.
7. Тукало М. А., Петрушенко З. М., Мацука Г. Х. Исследование элементов пространственной структуры тРНК<sup>Leu</sup> молочной железы коров методами химической модификации // Биоорг. химия.—1988.—13, № 1.—С. 31—36.
8. Петрушенко З. М., Гудзера О. И., Рожко О. Т., Тукало М. А., Мацука Г. Х. Определение участков взаимодействия тРНК<sup>Leu</sup> из молочной железы коров с гомологичной аминокотил-тРНК-синтетазой методом химической модификации // Биоорг. химия.—1990.—16, № 12.—С. 1647—1652.
9. Калачнюк Л. Г., Тукало М. А., Мацука Г. Х. Определение остатков фосфорной кислоты, участвующих в образовании пространственной структуры тРНК<sup>Cep</sup> печени быка // Биополимеры и клетка.—1992.—8, № 5.—С. 12—15.
10. Калачнюк Л. Г., Тукало М. А., Мацука Г. Х. Визначення ділянок взаємодії тРНК<sup>Cep</sup> печінки бика з гомологічною амінокотил-тРНК синтетазою методом хімічної модифікації // Укр. біохім. журн.—1992.—64, № 6.—С. 38—42.
11. Калачнюк Л. Г., Тукало М. А., Козак Л. А., Мацука Г. Х. Выделение и характеристика препарата индивидуальной исоакцепторной тРНК<sup>Cep</sup> из печени быка // Биополимеры и клетка.—1987.—3, № 5.—С. 274—276.

12. Gillman J., Millward S., Blew D., Tigerstrom M., Wimmer E., Tenner G. M. The separation of soluble ribonucleic acids on benzoyle d diethylaminoethylcellulose // *Biochemistry*.—1967.—6.—P. 3043—3056.
13. Гудзера О. И., Крикливий И. А., Яремчук А. Д., Тукало М. А. Выделение гистидиновой тРНК из *Thermus thermophilus* и изучение ее первичной структуры и участков взаимодействия с гомологичной аминоацил-тРНК синтетазой // *Биополимеры и клетка*.—2006.—22, № 3.—С. 201—209.
14. Петрушенко З. М., Коваленко О. П., Мальченко Н. Н., Крикливий И. А., Яремчук А. Д., Тукало М. А. Первичная структура тРНК<sup>Ser</sup> из *Thermus thermophilus* // *Биополимеры и клетка*.—1997.—13, № 3.—С. 202—208.
15. Yaremchuk A., Krikliiviy I., Mal'chenko N., Biou V., Berthet-Colominas C., Cusack S. A new crystal form of the complex between seryl-tRNA synthetase and tRNA from *Thermus thermophilus* that diffracts to 2.8 Å resolution // *FEBS Lett.*—1992.—310.—P. 157—161.
16. Biou V., Yaremchuk A., Tukalo M., Cusack S. The 2.9 Å crystal structure of *T. thermophilus* seryl-tRNA synthetase complexed with tRNA<sup>Ser</sup> // *Science*.—1994.—263.—P. 1404—1410.
17. Cusack S., Yaremchuk A., Tukalo M. The crystal structure of the ternary complex of *T. thermophilus* seryl-tRNA synthetase with tRNA<sup>Ser</sup> and seryl-adenylate analogue reveals a conformational switch in the active site // *The EMBO J.*—1996.—15.—P. 2834—2842.
18. Cayama E., Yopez A., Rotondo F., Bandeira E., Ferreras A. C., Triana-Alonso F. J. New chromatographic and biochemical strategies for quick preparativ isolation of tRNA // *Nucl. Acids Res.*—2000.—28.—E64—71.

УДК 577.217.335

Надійшла до редакції 07.08.06