



УДК 577.112.5

СИНТЕЗ ЗРИТЕЛЬНОГО РОДОПСИНА В БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЕ ТРАНСЛЯЦИИ

1. ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ СИНТЕТИЧЕСКОЙ мРНК ЗРИТЕЛЬНОГО ОПСИНА БЫКА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЕЕ ТРАНСЛЯЦИИ

*Зозуля С. А., Гуревич В. В., Шмуклер Б. Е.,
Наточин М. Ю., Звяга Т. А., Грязнов С. М.,
Широкова Е. П.*

*Филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Пущино*

Изучено влияние различных структурных изменений нетранслируемых областей и участка инициации трансляции синтезированных *in vitro* матричных РНК опсина быка на эффективность их трансляции в бесклеточной системе из зародышей пшеницы. Показано, что посредством оптимизации структуры 5'-нетранслируемой области мРНК можно достичь уровня синтеза опсина в 30 мкг на 1 мл трансляционной смеси.

Молекулярный механизм функционирования зрительных родопсинов млекопитающих — ретинальсодержащих мембранных белков сетчатки, являющихся первичными компонентами каскада зрительного возбуждения, представляет большой интерес для изучения. Одним из многообещающих подходов к структурно-функциональным исследованиям зрительного родопсина является использование методов белковой инженерии. Необходимое условие осуществления такого подхода — возможность экспрессии клонированного гена апобелка — опсина в какой-либо системе и получение функционально активного рекомбинантного родопсина. Синтез опсина в клетках *E. coli* представляется малоперспективным из-за трудностей в экспрессии чужеродных мембранных белков в этой системе [1, 2], а также в связи с проблематичностью последующей реконструкции рекомбинантного опсина и получения интегрированного в мембрану функционально активного родопсина. Более обещающими в этом плане выглядят эукариотические бесклеточные системы трансляции, к основным достоинствам которых относятся экспериментальная простота и быстрота цикла мутантный ген — мутантный белок, что существенно для успеха детальных исследований механизмов работы родопсина методами белковой инженерии. Однако применение таких систем для биосинтеза белка традиционно носит аналитический характер в связи со сравнительно невысокими уровнями экспрессии.

Ранее в работе [3] была показана возможность трансляции полученной *in vitro* мРНК гена зрительного опсина быка в бесклеточном экстракте из зародышей пшеницы и возможность по меньшей мере частичной встройки синтезированной полипептидной цепи в микросомальные мембраны.

Основной целью настоящей работы было изучение возможности препаративного синтеза зрительного опсина быка в бесклеточной системе трансляции из зародышей пшеницы в количествах, достаточных для структурно-функциональных исследований. В рамках этой задачи проводилось изучение влияния структурных изменений в 5'-нетранслируемой области и участке инициации трансляции опсиновой матричной РНК на эффективность ее трансляции *in vitro*.

Комплементарная ДНК гена зрительного опсина быка была выделена из библиотеки кДНК сетчатки быка путем гибридизации с двумя синтети-

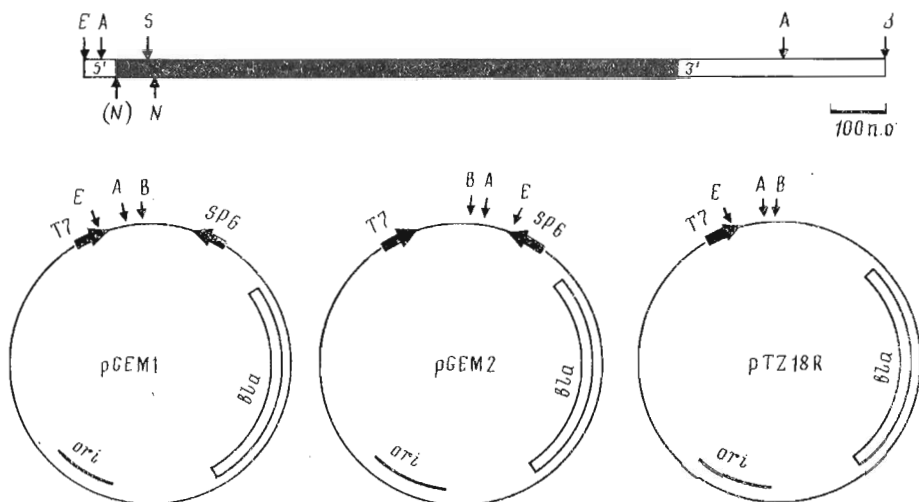


Рис. 1. Структура кДНК зрительного опсина и плазмидные векторы, использованные для его клонирования и транскрипции *in vitro*. Обозначения сайтов узнавания рестриктаз: А — *Ava*I, В — *Bam*HI, Е — *Eco*RI, S — *Scal*, N — *Nco*I, (N) — *Nco*I, возникающий в результате олигонуклеотиднаправленного мутагенеза. Широкие стрелки показаны промоторы T7 и SP6

ческими дезоксирибоолигонуклеотидными зондами*, комплементарными кодирующей последовательности гена, и сборки полноразмерной копии гена из трех позитивно гибридирующихся клонов, содержащих наиболее протяженные фрагменты последовательности кДНК опсина. Для подтверждения структуры гена была определена «дидезокси»-методом [4] полная нуклеотидная последовательность кДНК как 5'-нетранслируемой области и кодирующей области мРНК, так и 360 нуклеотидов 3'-нетранслируемой области. Полученная кДНК опсина содержит 68 нуклеотидов 5'-нетранслируемой области (из 96 у полноразмерной мРНК опсина [5]), полную нуклеотидную последовательность гена опсина и около 450 нуклеотидов 3'-нетранслируемой области. Сравнение полученной последовательности с установленной ранее Натансом и Хогнессом [5] выявляет три нуклеотидные замены в кодирующей последовательности, не приводящие к аминокислотным заменам в опсине, а именно $G^{519} \rightarrow A$, $T^{571} \rightarrow C$ и $A^{1248} \rightarrow G$ (нуклеотидные позиции указаны по [5]). Все обнаруженные замены подтверждены секвенированием соответствующих участков ДНК 2–3 клонов, независимо выделенных из библиотеки кДНК. Замены $G^{519} \rightarrow A$ и $A^{1248} \rightarrow G$ содержатся также в последовательности кДНК опсина, клонированной Куо и др. [6].

С целью получения транскриптов гена опсина *in vitro* ген был клонирован в специализированные векторы pGEM1, pGEM2 или pTZ18, содержащие промоторы фагов SP6 и T7. При этом в зависимости от выбора вектора и рестрикционных сайтов для клонирования вносились изменения в первичную структуру участка плазмидной ДНК, соответствующего 5'-нетранслируемой области получаемых транскриптов (рис. 1, таблица). Для синтеза мРНК соответствующую плазмидную ДНК переводили в линейную форму расщеплением рестриктазой, имеющей уникальный сайт узнавания с 3'-конца от клонированного гена (*Bam*HI или *Eco*RI), и транскрибировали *in vitro* соответствующей РНК-полимеразой.

Таким образом был сконструирован набор плазмид, с помощью транскрипции которых РНК-полимеразами SP6 или T7 можно получать опсиновые мРНК с вариациями в длине и нуклеотидной последовательности 5'-нетранслируемой области (таблица). Изучение трансляции такого набора мРНК представляет интерес, так как из общепринятой «сканирующей» модели, предложенной в работе [7], следует важная роль первичной

* Префикс «d» в структурных формулах дезоксирибоолигонуклеотидов для простоты опущен.

Структуры 5'-нетранслируемых областей опциновых мРНК и уровни их трансляции в бесклеточной системе *

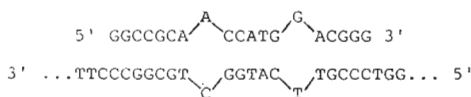
Плазмида (матрица)	Последовательность 5'-нетранслируемой области мРНК	Уровень синтеза опсина, мкг/мл
SP6-транскрипты		
pG2E6	GAAUACACGG AAUUC [*] CCCGCU GAGCUC [*] CGGC CUCAGAAGCA UCCCCGGGUU CGCGCCGCCG GCGGGCAGCC GCAAGGGCCG CAGCC AUG AAC...	15
pG2E6-T	GAAUACACGG AAUUC [*] CCCGCU GAGCUC [*] CGGC CUCAGAAGCA UCCCCGGGUU CGCGCCGCCG GCGGGCAGCC GCAAGGGCCG CAACC AUG GAC...	18
pG1A6	GAAUACAAGC UUGGG [*] CGUCA GGUCGACUCU AGAGGAUCCC CGGGUUCGGC CCGCCGGCGG GCAGCCGCAA GGGCCGCAGC C AUG AA ...	21
pG1A6-T	GAAUACAAGC UUGGG [*] CGUCA GGUCGACUCU AGAGGAUCCC CGGGUUCGGC CCGCCGGCGG GCAGCCGCAA GGGCCGC AAC C AUG GAC...	29
pG2A6	GAAUACACGG AAUUC [*] CAGCU CGCCCGGGUU CGCGCCGCCG GCGGGCAGCC GCAAGGGCCG CAGCC AUG AAC...	21
pG2A6-T	GAAUACACGG AAUUC [*] CAGCU CGCCCGGGUU CGCGCCGCCG GCGGGCAGCC GCAAGGGCCG CAACC AUG GAC...	29
pG2S6-I	GAAUACACGA AAUUUUUUUU UUUUUAAACC ACC AUG GAC...	29
T7-транскрипты		
pG1E7	GGGAGACCGG AAUUC [*] CCCGCU GAGCUC [*] CGGC CUCAGAAGCA UCCCCGGGUU CGCGCCGCCG GCGGGCAGCC GCAAGGGCCG CAGCC AUG AAC...	4
pG1E7-T	GGGAGACCGG AAUUC [*] CCCGCU GAGCUC [*] CGGC CUCAGAAGCA UCCCCGGGUU CGCGCCGCCG GCGGGCAGCC GCAAGGGCCG CAACC AUG GAC...	4
pG2A7	GGGAGACCGA AGCUUGGGCU GCAGGUCGAC UCUAGAGGAU CCCC [*] GGUUC GCGCCGCCGG CGGGCAGCCG CAAGGGCCG AGCC AUG AAC...	4
pG2A7-T	GGGAGACCGA AGCUUGGGCU GCAGGUCGAC UCUAGAGGAU CCCC [*] GGUUC GCGCCGCCGG CGGGCAGCCG CAAGGGCCG AACC AUG GAC...	4
pG1A7	GGGAGACCGG AAUUC [*] CAGCU CGCCCGGGUU CGCGCCGCCG GCGGGCAGCC GCAAGGGCCG CAGCC AUG AAC...	3
pG1A7-T	GGGAGACCGG AAUUC [*] CAGCU CGCCCGGGUU CGCGCCGCCG GCGGGCAGCC GCAAGGGCCG CAACC AUG GAC...	4
pG1S7-I	GGGAGACCGG AAUUUUUUUU UUUUUAAACC ACC AUG GAC ...	8
pT ^z S7-I	GGGAUUUUUU UUUUUUUUAA ACCACC AUG GAC...	12

* Подчеркнут иницирующий кодон трансляции AUG гена опсина. Наименования плазмид построены по следующей системе: первые три символа обозначают тип вектора, в который производилось клонирование гена (pG1=pGEM1, pG2=pGEM2, pTZ=pTZ18), четвертый определяет тип клонирования гена опсина (E — клонирование по EcoRI-BamHI-сайтам, A — по Aval-сайту, S — ген с синтетической 5'-нетранслируемой областью, клонированный по EcoRI-BamHI-сайтам), пятый — тип промотора (6=SP6, 7=T7); символ, следующий за дефисом, определяет изменения участка инициации трансляции (T — двойная мутация в старте трансляции, I — синтетический идеальный старт трансляции)

и вторичной структуры 5'-нетранслируемых участков эукариотических мРНК в модуляции эффективности трансляции этих матриц.

Еще одним важным структурным параметром, способным влиять на эффективность трансляции мРНК, является непосредственное окружение (нуклеотидный контекст) стартового AUG-кодона. Из рис. 2 видно, что этот контекст отличается от статистически предпочтительного для эукариотических мРНК [8]. С целью оптимизации этого контекста мы ввели с помощью олигонуклеотиднаправленного мутагенеза две нуклеотидные замены в предположительно наиболее важных позициях [8] вблизи стартового кодона гена опсина (G→A в позиции -3 и A→G в позиции +1) (рис. 2). Полученная двойная мутация была перенесена клонированием во все ранее сконструированные плазмиды для транскрипции in vitro гена опсина с тем, чтобы исследовать совместный эффект этой мутации и вариаций в 5'-нетранслируемой области мРНК.

МУТАГЕНИЗИРУЮЩИЙ ОЛИГОНУКЛЕОТИД



МАТРИЦА

Рис. 2. Схема олигонуклеотиднаправленного мутагенеза участка инициации трансляции гена опсина. Отмечен иницирующий кодон

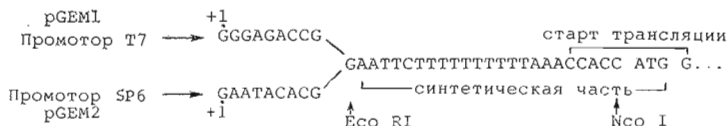


Рис. 3. Структура участков транскрипционных векторов pG2S6-1 и pG1S7-1, соответствующая синтетической модельной 5'-нетранслируемой области T7- и SP6-транскриптов гена опсина

Теоретически универсальным подходом к оптимизации экспрессии эукариотических генов в бесклеточных системах может являться подстройка к кодирующей области 5'-нетранслируемого участка, взятого из хорошо транслируемых мРНК. В работе [9] была показана высокая эффективность такого подхода при подстройке 5'-нетранслируемой области гена белка оболочки вируса мозаики люцерны к кодирующим областям генов α -амилазы ячменя и человеческого интерлейкина 1 β . Сравнение структур 5'-нетранслируемых областей многих из эффективно транслируемых генов эукариот позволяет заметить такие их очевидные сходства, как небольшая длина и низкая структурированность в сочетании с «хорошим» нуклеотидным контекстом стартового AUG-кодона [8]. С учетом этих критериев нами была исследована возможность использования модельной синтетической 5'-нетранслируемой области для оптимизации трансляции гена опсина. С этой целью 5'-нетранслируемая область гена опсина была заменена на идеализированную модельную путем клонирования химически синтезированного олигонуклеотидного дуплекса по сайтам *EcoRI* и *NcoI* в плазмиды pG2E6-T и pG1E7-T с получением плазмид pG2S6-1 и pG1S7-1 (рис. 3).

Важным элементом большинства эукариотических матричных РНК является 5'-концевая «кэп»-структура, наличие которой обеспечивает эффективную трансляцию матрицы и ее стабильность. Существуют различные методы введения «кэп»-структуры либо ее аналогов в синтезируемые *in vitro* SP6- и T7-транскрипты [10, 11], однако необходимость использования высоких концентраций дорогостоящих «кэп»-предшественников делает эту процедуру непрактичной для препаративной наработки матричных РНК. Анализ литературных данных показывает, что наличие «кэша» на мРНК не является абсолютно необходимым для ее эффективной трансляции в бесклеточной системе из зародышей пшеницы и не оказывает существенного влияния на стабильность мРНК в этой системе [12, 13]. В наших условиях введение «кэша» — m⁷G(5')ppp(5')Am в опсиновые мРНК плазмид pG1A6-T и pG2S6-1 повышало эффективность их трансляции вдвое. Однако понижение эффективности трансляции «некэпированной» мРНК по сравнению с ее кэпированным аналогом может быть компенсировано за счет увеличения концентрации мРНК в системе трансляции. В связи с вышесказанным в дальнейшей работе изучали трансляцию только «некэпированной» опсиновой мРНК.

Трансляция исследованных в работе опсиновых мРНК в присутствии [¹⁴C]Leu или [¹⁴C]Val показывает, что все они кодируют синтез идентичного полипептида с электрофоретической подвижностью, соответствующей молекулярному весу дегликозилированного зрительного опсина (39 кДа). Результаты иммуопреципитации трансляционных экстрактов

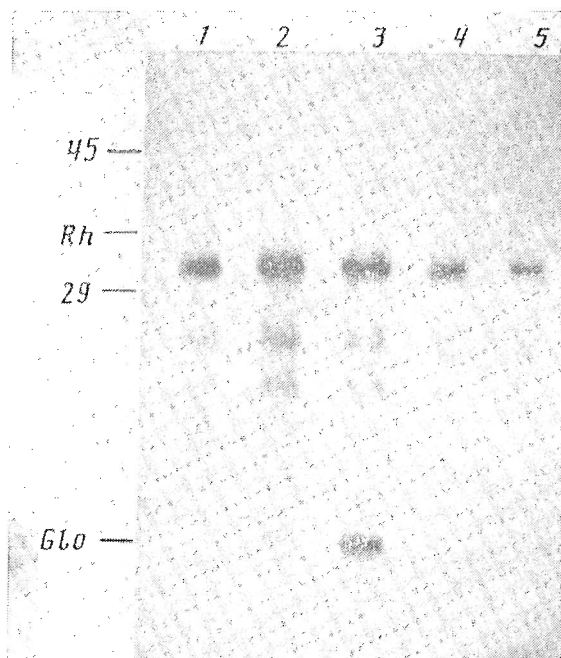


Рис. 4. Электрофорез в 12% SDS-ПААГ образцов ^{14}C -меченых продуктов трансляции транскриптов гена опсина: трансляция матрицы pG1S7-I (1), матрицы pG2S6-I (2), совместная трансляция матрицы pG2S6-I и препарата глобиновой мРНК кролика (3), 4 — то же, что и 3, с предварительной иммунопреципитацией поликлональными антителами к зрительному родопсину; 5 — иммунопреципитация образца 3 антителами к синтетическому пептиду из N-концевой области родопсина. Показано положение маркеров молекулярных масс (кДа), Glo — глобин, Rh — гликозилированный опсин быка

поликлональными антителами к природному родопсину и синтетическому пептиду SPFEARQYYLAE из N-концевой области родопсина также подтверждают синтез зрительного опсина быка в бесклеточной системе трансляции (рис. 4). Количественные оценки экспрессии опсина, сделанные по результатам включения ^{14}C -меченых аминокислот в кислотонерастворимую фракцию [14], показывают значительную зависимость уровня синтеза от типа использованной мРНК (таблица). В частности, очевидна более низкая эффективность трансляции всех T7-транскриптов по сравнению с их SP6-аналогами (в 3–7 раз).

Первичные структуры исследованных T7- и SP6-синтезированных опсиновых мРНК попарно идентичны, например мРНК в паре pG2E6 и pG1E7 и т. п. гомологичны, за исключением первых семи 5'-концевых нуклеотидов (5'GAATACA... у SP6-транскриптов и 5'GGGAGAC... у T7-транскриптов). Это структурное отличие вызвано тем, что точки инициации транскрипции SP6 и T7 РНК-полимеразами находятся внутри консенсусных последовательностей их промоторов, и, таким образом, транскрипция генов, клонированных в SP6- и T7-транскрипционные векторы, приводит к появлению «лишних» нуклеотидов на 5'-концах транскриптов. Существенный эффект 5'-концевых нуклеотидов на трансляцию может объясняться прямым влиянием первичной структуры этого участка «неэкспированной» матрицы на образование иницирующего комплекса либо склонностью к комплементарному взаимодействию с другими участками мРНК у GC-богатого 5'-конца T7-транскриптов. В ряде работ показано, что вторичная структурированность 5'-нетранслируемых областей мРНК, особенно включающая 5'-концевые 15 нуклеотидов и стартовый AUG-кодон, может значительно снижать эффективность их трансляции [15, 9]. Особенно важно отсутствие вторичной структуры для трансляции неэкспированных матриц, так как именно «кэп»-связывающий белок

участвует в плавлении вторичной структуры 5'-нетранслируемой области при инициации трансляции [13, 16]. Однако компьютерный анализ возможных вторичных структур 5'-нетранслируемых областей полученных нами SP6- и T7-мРНК не позволяет нам сделать однозначного вывода о корреляции между степенью структурированности и эффективностью трансляции этих матриц.

Обычно в эукариотических системах трансляции *in vitro*, особенно в системе из зародышей пшеницы, изменения 3'-нетранслируемой области мРНК мало влияют на эффективность ее трансляции [17-19]. В наших экспериментах часть матриц, например синтезируемых на плазмидах рG1A6, рG2A7, имела укороченный 3'-конец (ограниченный сайтом *Aval*). Нами были проведены эксперименты по сравнению эффективности трансляции транскриптов с плазмиды рG2S6-I, лилиаризованной рестриктазами либо *Sam*I, либо *Bam*HI, подтвердившие отсутствие эффекта такого структурного изменения 3'-нетранслируемой области на уровень синтеза описана.

Увеличение эффективности трансляции при оптимизации нуклеотидного контекста стартового AUG-кодона явно выражено для хорошо транслируемых мРНК (до 40%) и практически отсутствует для плохо транслируемых T7-транскриптов (таблица). В рамках сканирующей модели можно предположить, что влияние контекста сказывается, если образование иницирующего комплекса на 5'-конце мРНК достаточно эффективно и перестает быть лимитирующим скоростью этапом трансляции. Максимальные уровни синтеза описина достигаются при трансляции SP6- и T7-транскриптов с модельной синтетической 5'-нетранслируемой областью и «идеальным» [8] контекстом AUG-кодона. Возможно, подстройка такой идеализированной 5'-нетранслируемой области может быть универсальным способом повышения экспрессии гетерологичных генов в системе трансляции из зародышей пшеницы.

Таким образом, оптимизация структуры 5'-нетранслируемой области мРНК зрительного описина позволяет достигать в системе трансляции *in vitro* уровень экспрессии описина до 30 мкг белка на 1 мл трансляционной смеси. Полученный уровень достаточен для структурно-функциональных исследований родопсина методами белковой инженерии.

Авторы благодарят сотрудников ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР Н. Г. Абдулаева за ценные советы и помощь в работе, В. М. Липкина и сотрудников его лаборатории за предоставление банка кДНК, Н. Ф. Богомолу и Л. Г. Мустаеву (филиал ИБХ) за синтез пептида.

Экспериментальная часть

В работе использовали РНК-полимеразу SP6 либо производства Boehringer-Mannheim (ФРГ), либо выделенную нами из зараженной фагом SP6 биомассы *Staphylococcus typhimurium* по методу [20]. Препараты T7-РНК-полимеразы предоставлены О. Б. Ярчуком (Институт белка АН СССР), А. В. Честухиным (ИБХ АН СССР) либо выделены нами из питамма-суперпродуцента *E. coli*/рAR 1219, как описано в работе [21]. Ингибитор РНКаз (РНКазин) из плаценты человека выделяли по методу [22]. В работе использовали «кзи»-аналог m⁷G(5')ppp(5') Am (P-L Biochemicals, США), протеин А-сефарозу (Pharmacia, Швеция), плазмидные векторы рUC8, рUC18 [23], рGEM1 и рGEM2 (Promega, США) и рTZ18 (Pharmacia, Швеция).

Олигонуклеотиды, использованные в работе, синтезировали модифицированным твердофазным фосфитамидным методом с применением полуавтоматического синтезатора, разработанного В. М. Росташовым, И. П. Черновым и др. (ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР) [24, 25]. После полного деблокирования олигонуклеотиды очищали электрофорезом в денатурирующем 15-20% полиакриламидном геле. Соответствие структуры олигонуклеотидов плацируемой подтверждали секвенированием соответствующих участков ДНК после клонирования или мутагенеза.

Компьютерный анализ структур ДНК и РНК проводили на ПЭВМ «Искра-226» с использованием пакета программ «SEQBUS», предоставленного А. А. Александровым (ИМГ АН СССР).

Клонирование кДНК зрительного описина. Скрининг плазмидной библиотеки кДНК из сетчаток глаз быка (около 500 000 клонов) [26] вели гибридизацией с синтетическими олигонуклеотидными зондами ATGAACGGGACCGAGGGCC и CCSTCGG-TCCCGTTCAT, комплементарными кодирующей последовательности гена зрительного описина быка [5]. Полпоразмерная копия гена была получена сборкой фрагментов

плазмид из трех позитивно гибридизующихся клонов. Нуклеотидную последовательность кДНК определяли модифицированным методом Сэнгера [4], клонируя в полилинкеры фагов M13mp18 и M13mp19 субфрагменты, полученные расщеплением гена рестриктазами *HpaI*, *AluI*, *TaqI*. Встроенную в *SmaI*-сайт вектора pUC8 кДНК-копию гена описана размером 1,5 т. п. о. выщепляли рестриктазами *BamHI* и *EcoRI* и использовали для конструирования транскрипционных плазмид, описанных в тексте, с применением стандартных методик клонирования [27].

Олигонуклеотиднаправленный мутагенез (рис. 2) проводили в соответствии с двухиримерной методикой [28], используя в качестве матрицы одностороннюю форму фага M13mp19-RH, полученной клонированием полноразмерной кДНК-копии гена описана по *EcoRI* – *BamHI*-сайтам вектора M13mp19. После достройки матрицы ДНК-полимеразой ее расщепляли рестриктазами *EcoRI* и *ScaI* и клонировали в плазмиду pG2E6 вместо фрагмента *EcoRI*–*ScaI* (0,15 т. п. о.) дикого типа. Целевые клоны отбирали гибридизацией колоний с мутагенизирующим олигонуклеотидом в жестких условиях [29].

После ретрансформации *E. coli* и повторного скрининга гибридизацией структуру всего фрагмента *EcoRI* – *ScaI*, подвергающегося мутагенезу *in vitro*, подтверждали секвенированием по Сэнгеру [4].

Транскрипцию *in vitro* плазмидных ДНК с геном описана, клонированным под контроль SP6- или T7-промоторов, проводили в соответствии с литературными рекомендациями [30]. В типичном эксперименте транскрипцию вели в объеме 200 мкл в течение 2 ч при 37°С в присутствии 40 мМ трис-НСl, рН 7,5, содержащего 6 мМ MgCl₂, 2 мМ спермидин, 10 мМ дитиотреит, по 1,5 мМ АТР, ГТР, СТР и УТР, 500 ед. акт./мл РНКазина, 30 нМ линейной матричной ДНК и 20–100 ед. акт. T7- или SP6-РНК-полимераза. Для «экспирования» РНК вместо 1,5 мМ ГТР использовали смесь 0,75 мМ ГТР и 0,75 мМ m⁷G(5')ppp(5')Am. Для удаления ДНК пробу обрабатывали ДНКазой I (100 ед. акт./мл). После экстракции фенолом и хлороформом РНК осаждали 2,5 М LiCl [3] и определяли ее количество спектрофотометрически. При этом из 1 мкг плазмидной ДНК обычно получали 10–15 мкг мРНК описана.

Трансляцию мРНК вели в экстракте из зародышей пшеницы по модифицированному методу [14] в буфере, содержащем 50 мМ ацетат калия (рН 7,5), 2 мМ ацетат магния, 3 мМ дитиотреит, 0,08 мМ спермидин, 1,2 мМ АТР, 0,08 мМ ГТР, 30 мМ креатинфосфат, 0,7 мг/мл креатинфосфокиназы, 50 мкг/мл тРНК из мозжечка быка, 250 ед. акт./мл РНКазина, 0,1 мкг/мл пеллестатина А, 0,1 мкг/мл лейпептина, 0,1 мг/мл ингибитора трипсина из соевых бобов и 50 мкМ каждой из 19 аминокислот при 23°С в течение 90 мин. Уровень синтеза белка определяли по включению [¹⁴С]лейцина или [¹⁴С]валина (50 мкМ, 0,2 Ки/ммоль, Chemarol, СССР) в осаждаемые трихлоруксусной кислотой продукты по методу [14], данные для каждого типа мРНК усредняли по 3–5 независимым экспериментам. В типичном эксперименте в аналитическую пробу объемом 20 мкл добавляли 1–12 мкг мРНК (оптимальная концентрация мРНК – около 200 мкг/мл – была определена для каждого типа матрицы). Копированную мРНК транслировали в тех же условиях, но в присутствии 90 мМ ацетата калия.

Получение антисыворотки и иммунопреципитация рекомбинантного описана. Для иммунизации кроликов синтетический 12-членный пептид описана (остатки 22–33, SPFEARQYYLAEE) конъюгировали с бычьим сывороточным альбумином (BSA) по методу [31]. К 4 мг BSA в 3 мл 0,1 М NaHCO₃, рН 8,2, добавляли 6,6 мг пептида в 100 мкл воды. Глутаровый альдегид (32 мкл, 0,25 М) добавляли порциями по 3,2 мкл каждые 30 мин при перемешивании при 25°С. Затем реакционную смесь анализировали 24 ч при 40°С против 1 л 10 мМ фосфата калия, рН 7,2, содержащего 0,15 М NaCl.

Кроликов иммунизировали тремя подкожными инъекциями в интервалом 14 сут, вводя по 700 мкг конъюгата или по 200 мкг раствора родоцина быка, выделенного по методу [32], в 1% SDS. Для первой инъекции раствор антигена смешивали с полным, а для 2-й и 3-й – с неполным адьювантом Фрейнда. Через 8 сут после 3-й инъекции у животных брали кровь из ушной вены. Фракцию антител выделяли осаждением сульфатом аммония.

Для иммунодетекции описана к 20 мкл экстракта после трансляции мРНК добавляли 80 мкл буфера для иммунопреципитации (10 мМ трис-НСl (рН 7,5), 0,1 М NaCl, 1 мМ EDTA, 1% детергента NP-40), а затем 5 мкл антисыворотки (титр 1:100) и инкубировали в течение 3 ч при 22°С. Комплексы, образованные антителами, осаждали инкубацией в течение 40 мин при 22°С с 20 мкл протеин А-сефарозы с последующей отмывкой четырехкратными ресуспендированием в 1 мл буфера для иммунопреципитации и центрифугированием при 2000g (1 мин). Осадок суспендировали в буфере для электрофореза и фракционировали в 14% SDS-ПААГ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Karnik S. S., Nassal M., Doi T., Jay E., Sgaramella V., Khorana H. G. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. № 19. P. 9255–9263.
2. Kanazawa H., Kiyasu T., Noumi T., Futai M. // J. Bacteriol. 1984. V. 158. № 1. P. 300–306.
3. Friedlander M., Blobel G. // Nature. 1985. V. 318. № 6044. P. 338–343.
4. McCrow R. A. // Anal. Biochem. 1984. V. 143. № 2. P. 298–303.
5. Nathans J., Hogness D. S. // Cell. 1983. V. 34. № 3. P. 807–814.
6. Kuo C.-H., Yamagata K., Moyzis R. K., Bitensky M. W., Miki N. // Mol. Brain Res. 1986. V. 1. № 3. P. 251–260.

7. Kozak M. // Cell. 1986. V. 44. № 2. P. 283—292.
8. Kozak M. // Nature. 1984. V. 308. № 5956. P. 241—246.
9. Jobling S. A., Gehrke L. // Nature. 1987. V. 325. № 6105. P. 622—625.
10. Konarska M. M., Padget R. R., Sharp P. A. // Cell. 1984. V. 38. № 3. P. 731—736.
11. Nielsen D. A., Shapiro D. J. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 14. P. 5936—5959.
12. Krieg P. A., Melton D. A. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 18. P. 7057—7070.
13. Gehrke L., Auron P. E., Quigly G. J., Rich A., Sonnenberg N. // Biochemistry. 1983. V. 22. № 22. P. 5157—5164.
14. Erickson A., Blobel G. // Meth. Enzymol. 1983. V. 96. P. 38—49.
15. Lawson T. G., Ray B. K., Dodds J. T., Grifo J. A., Abramson R. D., Merrick W. C., Betsch D. F., Weith H. L., Thach R. E. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 30. P. 13979—13989.
16. Ederly I., Lee K. A. W., Sonnenberg N. // Biochemistry. 1984. V. 23. № 11. P. 2456—2462.
17. Morle F., Godet J. // J. Mol. Biol. 1987. V. 193. № 4. P. 815—818.
18. Soreq H., Sagar O. D., Sehgal P. B. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 3. P. 1741—1745.
19. Krays V., Wathelet M., Poupart P., Contreras R., Fiers W., Content J., Huez G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 17. P. 6030—6034.
20. Buller E. T., Chamberlin M. J. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 10. P. 5772—5778.
21. Davanloo P., Rosenberg A. H., Dunn J. J., Studier F. W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 7. P. 2035—2039.
22. Blackburn P. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 24. P. 12484—12487.
23. Yanish-Perron C., Vieira J., Messing J. // Gene. 1985. V. 32. № 1. P. 103—119.
24. Beaucage S., Caruthers M. H. // Tetrahedron Lett. 1981. V. 22. № 20. P. 1859—1862.
25. Грязнов С. М., Чернов И. П., Поганов В. К., Пурмаль А. Л., Метелеев В. Г., Елов А. А., Шабарова З. А. // Биоорган. химии. 1986. Т. 12. № 12. С. 1604—1611.
26. Ovchinnikov Yu. A., Lipkin V. M., Kumarev V. P., Gubanov V. V., Khramtsov V. V., Akhmedov N. B., Zagranichny V. E., Muradov K. G. // FEBS Lett. 1986. V. 204. № 2. P. 288—292.
27. Мануарис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. // Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
28. Sims P. F. C., Minter S. J., Stancombe R., Gent M. E., Andrews J., Waring R. B., Towner P., Davies R. W. // Biochemie. 1985. V. 67. № 7/8. P. 841—847.
29. Zoller M. J., Smith M. // Meth. Enzymol. 1983. V. 100. P. 468—500.
30. Melton D. A., Krieg P. A., Rebagliatti M. R., Maniatis T., Zinn K., Green M. R. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 18. P. 7035—7056.
31. Audibert F., Jolivet M., Chedid L., Arnon R., Sela M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 16. P. 5042—5046.
32. Yamanaka G., Eckstein F., Stryer L. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 18. P. 8094—8101.

Поступила в редакцию
20.IV.1988

SYNTHESIS OF VISUAL RHODOPSIN IN A CELL-FREE TRANSLATION SYSTEM.

1. INFLUENCE OF THE STRUCTURE OF THE SYNTHETIC BOVINE VISUAL OPSIN mRNA ON ITS TRANSLATIONAL EFFICIENCY

ZOZULYA S. A., GUREVICH V. V., SHMUKLER B. E., NATOCHIN M. Yu.,
ZVYAGA T. A., GRYAZNOV S. M., SHIROKOVA E. P.

*Branch of M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Pushchino, Moscow Region*

Influence of structural changes in nontranslated regions and translation initiation site of the in vitro synthesized bovine opsin mRNA on its translational efficiency in the wheat germ cell-free system has been studied. It is shown that level of the opsin synthesis up to 30 µg per 1 ml of translational mixture can be attained by optimizing structure of 5'-nontranslated region.