

Н. В. БЕЛИЦЫНА, А. С. ГИРШОВИЧ, академик А. С. СПИРИН

ТРАНСЛЯЦИЯ ПОЛИНУКЛЕОТИДНОЙ МАТРИЦЫ НА ТВЕРДОМ НОСИТЕЛЕ

Создание бесклеточной системы биосинтеза белка, работающей на твердом носителе, представляет собой задачу особой важности. Вместе с тем до сих пор не было описано случаев, когда бы удалось создать эффективно работающую бесклеточную систему синтеза белков или полипептидов (трансляции) с участием рибосом или полинуклеотидных матриц, ковалентно связанных с каким-либо твердофазным носителем. В настоящей работе описана такая система: на полиуридилиловой кислоте (полиУ), ковалентно связанной с целлюлозой, удалось получить рибосомный синтез полифенилаланина.

Рибосомы выделяли из *Escherichia coli* MRE-600 и очищали с помощью повторных центрифугирований из 1 М NH_4Cl — 0,01 М MgCl_2 (¹⁻³). Получение тотальной тРНК *E. coli*, ферментативное aminoacyлирование этой тРНК ¹⁴C-L-фенилаланином (удельная активность 500 С/моль), очистку ¹⁴C-фенилаланил-тРНК (удельная активность 310 000 имп/мин на 1 мг тотальной тРНК) и получение фракции белковых трансферных факторов, свободной от рибосом и нуклеиновых кислот, производили как описано ранее (³). Были использованы препараты полиУ и ГТФ фирмы «Реанал» (Венгрия).

Для получения смолы с ковалентно присоединенным полинуклеотидом использован принцип, основанный на образовании гидразоновых производных смолы с полирибонуклеотидами, окисленными периодатом (⁴). В качестве твердого носителя (смолы) для ковалентного присоединения к ней полиУ была взята карбоксиметилцеллюлоза (КМ-целлюлоза) типа CM-32 фирмы «Ватман» (Англия). Смолу, предварительно переведенную в H^+ -форму, обрабатывали сухим метанолом с газообразным HCl в течение 4—5 час. при 20°. Полученные в результате метиловые эфиры карбоксильных групп смолы подвергали затем гидразинолизу путем обработки свежеперегнанным гидратом гидроксиламина в течение 10—15 час. при 20°. ПолиУ подвергали окислению периодатом натрия при концентрации полиУ 8 мг/мл и NaJO_4 8 мг/мл в течение 1 часа при комнатной температуре в темноте; по окончании реакции избыток периодата удаляли добавлением ацетата калия на холоду (основная масса периодата осаждается в виде KJO_4) и последующими переосаждениями полиУ спиртом. Реакцию окисленной полиУ с гидразидом КМ-целлюлозы проводили в основном исходя из условий, отработанных Василенко и др. (⁵), для связывания окисленной РНК с гидразидом полиакриламидного геля. Реакцию вели при концентрациях 1,7 мг окисленной полиУ и 60 мг гидроксиламина КМ-целлюлозы на 1 мл смеси, в 1 М KCl — 0,05 М CH_3COOK pH 4,5, в течение 15—20 час. при комнатной температуре с перемешиванием. Таким образом, в результате был получен продукт, где полиУ ковалентно связана своим 3'-концом с целлюлозным носителем. Количество ковалентно связанной полиУ колебалось в разных препаратах в пределах 6—13 мг полиУ на 1 г КМ-целлюлозы.

Для сравнительной оценки эффективности трансляции свободной и ковалентно связанной полиУ в бесклеточной системе была поставлена первая серия опытов, где рибосомы взяты в недостатке по отношению к дру-

гим компонентам системы. Опытные пробы содержали 20—22 $\mu\text{г}$ рибосом; 100 $\mu\text{г}$ тРНК, аминокислотированной ^{14}C -фенилаланином; 20—25 $\mu\text{г}$ белка, содержащего трансферные факторы; 26 $\mu\text{г}$ ГТФ; около 20—25 $\mu\text{г}$ полиУ — свободной или ковалентно связанной с целлюлозой (в последнем случае в пробу вносили 2,3 мг КМ-целлюлозы со связанной полиУ). Инкубацию проводили в 0,01 М MgCl_2 — 0,1 М KCl — 0,001 М дитиотреитол — 0,01 М трис- HCl , pH 7,1 при 25°; объем каждой пробы был 0,2 мл.

В случае опытов со свободной полиУ реакцию останавливали через различные промежутки времени путем охлаждения до 4° и разбавления до

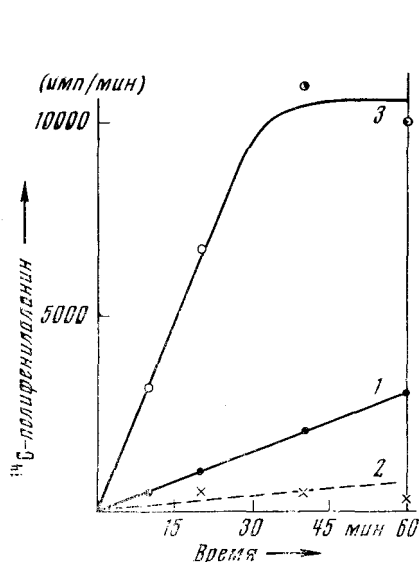


Рис. 1

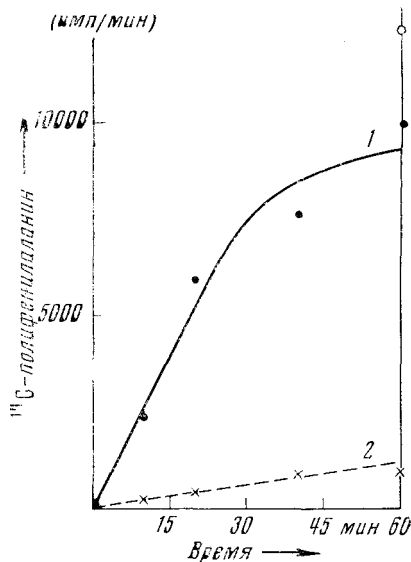


Рис. 2

Рис. 1. Кинетика синтеза ^{14}C -полифенилаланина в бесклеточных системах на полиУ, ковалентно присоединенной к КМ-целлюлозе (1), и на свободной полиУ (3) в условиях недостатка рибосом. 2 — ^{14}C -полифенилаланин, освобождаемый в ходе инкубации в системе с ковалентно присоединенной полиУ

Рис. 2. Кинетика синтеза ^{14}C -полифенилаланина в бесклеточных системах на полиУ, ковалентно присоединенной к КМ-целлюлозе (1) в условиях избытка рибосом. 2 — то же, что на рис. 1

5 мл холодным буфером 0,01 М MgCl_2 — 0,1 М KCl — 0,01 М трис- HCl , pH 7,1. К пробам добавляли трихлоруксусную кислоту до 5%, проводили гидролиз проб при 90°, и в кислотонерастворимом осадке измеряли радиоактивность, как описано ранее (3). В случае проб со связанной полиУ по истечении определенного времени инкубации реакцию также останавливали охлаждением и разбавлением пробы буфером с 0,01 М MgCl_2 . Затем смолу в пробах со связанной полиУ промывали буфером 0,01 М MgCl_2 — 0,1 М KCl — 0,01 М трис- HCl , pH 7,1 для удаления фрагментированной в ходе инкубации полиУ и транслирующих ее рибосом, если таковые имеются. После этого промывку смолу обрабатывали 0,5 М NaCl для элюции с нее рибосом, транслирующих связанную полиУ; обе фракции рибосом отдельно осаждали трихлоруксусной кислотой, гидролизовали при 90°, и считали радиоактивность осадков. Данные представлены на рис. 1.

Следует указать, что к представленным опытам были поставлены необходимые контроли для проверки неспецифической сорбции радиоактивного материала на смоле. Во-первых, были поставлены пробы, где проводили инкубацию всех компонентов системы, за исключением рибосом; последующая промывка смолы буфером с 0,01 М MgCl_2 и 0,5 М NaCl показала, что материал, не растворимый в горячей трихлоруксусной кислоте,

содержит не более 100 имп/мин на 2—4 мг смолы, т. е. на пробу. Во-вторых, было выяснено, что синтез ^{14}C -полифенилаланина на свободных полиУ в присутствии смолы также не приводит к заметной сорбции радиоактивного полипептида на смоле; материал, отмываемый от смолы 0,5 М NaCl и не растворимый в горячей трихлоруксусной кислоте, содержал не более 100—200 имп/мин на 2—4 мг смолы, при 10 000 имп/мин синтезированного в пробе ^{14}C -полифенилаланина.

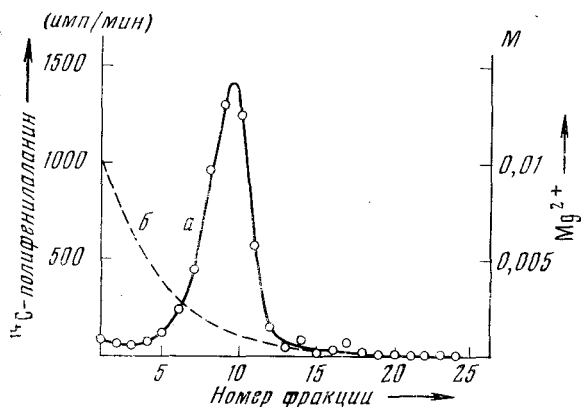


Рис. 3. Элюция рибосом, содержащих ^{14}C -полифенилаланин (а), из колонки с полиУ-целлюлозной смолой при понижении концентрации MgCl_2 (б)

ных фрагментах полиУ в такой системе относительно невелик (кривая 2). Однако в системе со свободной полиУ синтез ^{14}C -полифенилаланина протекает более эффективно: общая скорость синтеза выше, и уже через 30—40 мин. кривая нарастания количества продукта выходит на плато (кривая 3).

При отсутствии естественной термации в системе, разница между кривыми 1 и 3 может быть объяснена либо замедленной скоростью трансляции на связанной со смолой полиУ, либо менее эффективным присоединением рибосом к этой полиУ. Для выбора из двух альтернативных объяснений были поставлены опыты по конкуренции между свободной и связанной полиУ за рибосомы (табл. 1). В опытные пробы вводили одновременно свободную полиУ и полиУ, связанную со смолой, и через 60 мин инкубации бесклеточной системы (при 25°) определяли вышеописанным способом количество ^{14}C -полифенилаланина, синтезированного на свободных и связанных матрицах. Из табл. 1 видно, что при недостатке рибосом свободная полиУ сильно ингибирует трансляцию на связанной полиУ. Объяснение этих опытов может быть лишь таким, что рибосомы гораздо более эффективно соединяются со свободной полиУ, чем со связанной полиУ.

Чтобы преодолеть этот барьер замедленного присоединения рибосом к

Таблица 1

№ опыта	Инкубационная смесь (μг)	Количество синтезированного ^{14}C -полифенилаланина, имп/мин	
		на свободной полиУ	на связанной полиУ
1	Свободная полиУ (17)	11050	—
	Связанная полиУ (27)	—	3410
	Смесь свободной полиУ (17) и связанной полиУ (27)	10110	350
2	Свободная полиУ (1,7)	5840	—
	Связанная полиУ (27)	—	3410
	Смесь свободной полиУ (1,7) и связанной полиУ (27)	5850	1570

Примечание. Состав 0,2 мл инкубационной смеси: 22 μг рибосом; 100 μг тРНК, аминокислотированной ^{14}C -фенилаланином; 20 μг белка, содержащего трансферные факторы; 26 μг ГТФ. Инкубацию проводили в 0,01 М MgCl_2 — 0,1 М KCl — 0,001 М дитиотреитол — 0,01 М трис-HCl, pH 7,1 в течение 60 мин. при 25°. По окончании опыта определялось количество ^{14}C -фенилаланина, нерастворимого в горячей трихлоруксусной кислоте, раздельно в рибосомах, присоединенных к свободной полиУ (отмывались от смолы буфером с 0,01 М MgCl_2), и в рибосомах, присоединенных к связанной со смолой полиУ (отмывались от смолы 0,5 М NaCl).

связанной полиУ, была поставлена следующая серия опытов, где рибосомы давались в избытке по отношению к полиУ. Опытные пробы содержали 150 мкг рибосом; 200 мкг тРНК, аминоацелированной ^{14}C -фенилаланином; 100 мкг белка, содержащего трансферные факторы; 26 мкг ГТФ; 30 мкг полиУ, присоединенной к 4,2 мкг КМ-целлюлозы. Инкубацию проводили в тех же ионных и температурных условиях, которые описаны выше; объем каждой пробы был 0,25 мл. Через определенные промежутки времени пробы обрабатывали для определения синтеза ^{14}C -полифенилаланина на связанных и на освободившихся в ходе инкубации матрицах, как описано выше. Данные представлены на рис. 2, из которого видно, что при инкубации в избытке рибосом полиУ, связанная со смолой, транслируется с хорошей эффективностью, и кривая накопления ^{14}C -полифенилаланина через 30–40 мин. начинает выходить на плато.

В заключительной серии опытов после завершения инкубации системы (60 мин. при 25°) опытную смесь со связанной полиУ помещали в хроматографическую колонку, смолу в колонке промывали буфером 0,01 М MgCl_2 — 0,1 М KCl — 0,01 М трис- HCl , pH 7,2, а затем рибосомы, транслировавшие связанную полиУ и содержащие новосинтезированный ^{14}C -полифенилаланин, элюировали буфером 0,1 М KCl — 0,01 М трис- HCl , pH 7,2, с экспоненциально понижающейся концентрацией MgCl_2 . Из данных, представленных на рис. 3, видно, что практически все рибосомы, транслирующие связанную со смолой полиУ (содержащие ^{14}C -полифенилаланин), диссоциируют от матрицы в районе 0,001 М MgCl_2 и выходят из колонки одним симметричным пиком.

Таким образом, из совокупности приведенных экспериментальных данных следует, что рибосомы могут эффективно транслировать полинуклеотидную матрицу, которая ковалентно связана своим 3'-концом с твердым носителем целлюлозного типа.

Приносим благодарность Е. С. Бочкаревой за большую помощь в получении препаратов КМ-целлюлозы с ковалентно связанной полиУ.

Институт белка
Академии наук СССР
Пушино-на-Оке

Поступило
31 I 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. Pestka, J. Biol. Chem., **243**, 2810 (1968). ² R. W. Erbe, M. M. Nau, P. Leder, J. Mol. Biol., **39**, 441 (1969). ³ Л. П. Гаврилова, В. В. Смолянинов, Молекулярная биол., **5**, 883 (1971). ⁴ Д. Г. Кнорре, С. Д. Мызина, Л. С. Сагдахчиев, Изв. СО АН СССР, сер. хим. наук, **11**, 134 (1964). ⁵ С. К. Василенко, Л. В. Обухова, В. И. Ямковой, Биохимия, **36**, 1288 (1971).