



УДК 577.112.5

© 1992 г. М. А. Кутузов, В. Е. Шмуклер, О. Н. Суслов,
А. А. Заргаров, Н. Г. Абдулаев**P26 — КАЛЬЦИЙСВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК ФОТОРЕЦЕПТОРНЫХ
КЛЕТОК СЕТЧАТКИ БЫКА: ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА
И ЭКСПРЕССИЯ В *E. COLI***

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва

Определена первичная структура кальцийсвязывающего белка P26 из сетчатки быка путем параллельного анализа аминокислотной последовательности пептидов этого белка и нуклеотидной последовательности соответствующей кДНК. Белок полностью идентичен рековерину, и его первичная структура на 59% совпадает с аминокислотной последовательностью визинина — кальцийсвязывающего белка из колбочек сетчатки цыплят. P26 был экспрессирован в *Escherichia coli* в виде химерного белка. Экспрессированный химерный белок был очищен аффинной хроматографией на IgG-сефарозе 6FF. P26 был получен расщеплением химерного белка энтеропептидазой.

Снижение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} является одним из следствий световой активации наружных сегментов палочек (НСП) в фоторецепторных клетках позвоночных. Оно происходит в результате закрытия сGMP-зависимых каналов в плазматической мембране НСП и непрерывной работы Na^+ , K^+ , Ca^{2+} -обменника [1–3]. Показано, что такое снижение концентрации ионов Ca^{2+} играет ключевую роль в запуске процессов темновой и световой адаптации фоторецепторных клеток через механизм отрицательной обратной связи [4–6]. Снижение внутриклеточного уровня Ca^{2+} влияет и на гуанилатциклазу фоторецепторов, увеличивая синтез сGMP [7–11].

Фосфодиэстераза сGMP (ФДЭ) также чувствительна к внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} [12–13]. Недавно было показано, что ионы Ca^{2+} в физиологических пределах концентраций регулируют световую активацию ФДЭ сетчатки лягушки [14]. Чувствительность и гуанилатциклазы, и ФДЭ к уровню Ca^{2+} опосредуется растворимыми белками с молекулярной массой 26 кДа, обнаруженными в сетчатках быка и лягушки [14].

Для детального структурно-функционального изучения этих белков необходимо знание их первичной структуры и нуклеотидной последовательности кодирующих их генов. С этой целью мы клонировали кДНК, кодирующую белок с молекулярной массой 26 кДа из НСП сетчатки быка (обозначаемый в дальнейшем как P26). После определения его первичной структуры и нуклеотидной последовательности соответствующей кДНК мы сосредоточили усилия на изучении структурных основ функционирования этого белка. Нам удалось экспрессировать в клетках *Escherichia coli* химерный белок, состоящий из фрагмента белка А, последовательности, специфично расщепляемой энтеропептидазой, и белка P26.

Принятые сокращения: НСП — наружные сегменты палочек; ФДЭ — фосфодиэстераза сGMP; сGMP — гуанозин-3':5'-циклический монофосфат; IPTG — изопропил-β-D-1-тиогаллактопиранозид; SDS — додецилсульфат натрия; HEPES — N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновая кислота); BSA — бычий сывороточный альбумин.

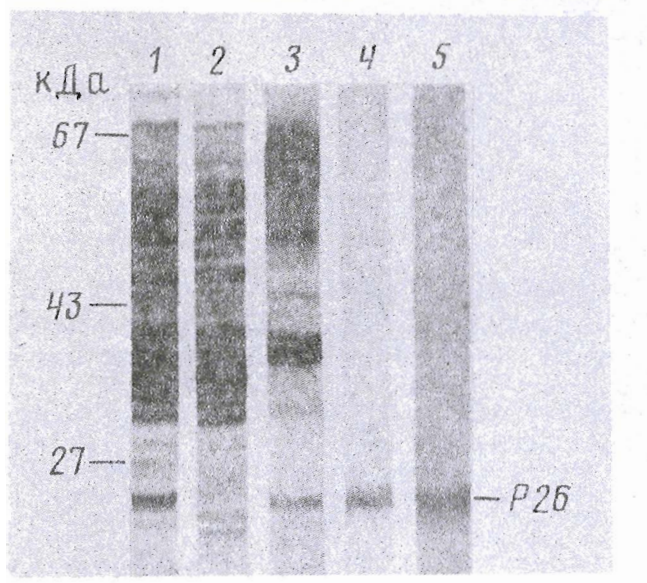


Рис. 1. SDS-электрофорез фракции растворимых белков НСП (1), фракции белков, не связываемых фторсорбом (2), связываемых фторсорбом белков после элюирования октилглюкозидом (3) и фракции, содержащей очищенный P26 после рехроматографии на колонке с Mono Q (детектирование окрашиванием кумасси R-250, как описано в «Экспериментальной части»). «Кальциевый» блот очищенного P26 (5) (см. текст)

В настоящее время существуют как минимум четыре метода выделения P26. Исходно P26 был получен с помощью аффинной хроматографии на колонке с SepA-сефарозой, через которую предварительно пропускали солилизированные в детергенте мембраны НСП, а затем изотонический экстракт мембран НСП, содержащий P26 [15]. Два других метода базируются на избирательном (зависящем от концентрации ионов Ca^{2+}) связывании этого белка с фенол-сефарозой либо с мембранами дисков НСП [14, 16]. Описан также метод, основанный на тепловой денатурации и преципитации большинства растворимых белков НСП; при этом P26 остается в растворе [17]. Во всех указанных случаях в качестве конечной стадии очистки использовали ионообменную хроматографию.

Разработанная нами методика выделения P26 основана на наблюдении, что фторсорб (сизликагель, покрытый тефлоном) избирательно связывает P26 вместе с тремя другими белками с более высокими молекулярными массами. Попытки элюировать с колонки P26 с помощью EDTA или растворов низкой ионной силы были безуспешны. Однако сорбированные белки легко элюировались такими детергентами, как лаурилдиметиламинооксид или октилглюкозид, после чего P26 подвергали дальнейшей очистке с помощью ионообменной хроматографии или гель-фильтрации. Очищенный белок мигрирует при SDS-электрофорезе в виде единственной полосы с молекулярной массой 26 кДа и дает положительный сигнал на «кальциевом» блоте (рис. 1).

Попытки секвенирования выделенного нами белка были безуспешны из-за того, что его N-конец оказался блокированным; природа защитной группы пока остается неизвестной. Для фрагментации P26 использовали его расщепление по остаткам метионина бромцианом и протеолиз клострипептином. CNBr-пептиды, а также пептиды после протеолиза клострипептином

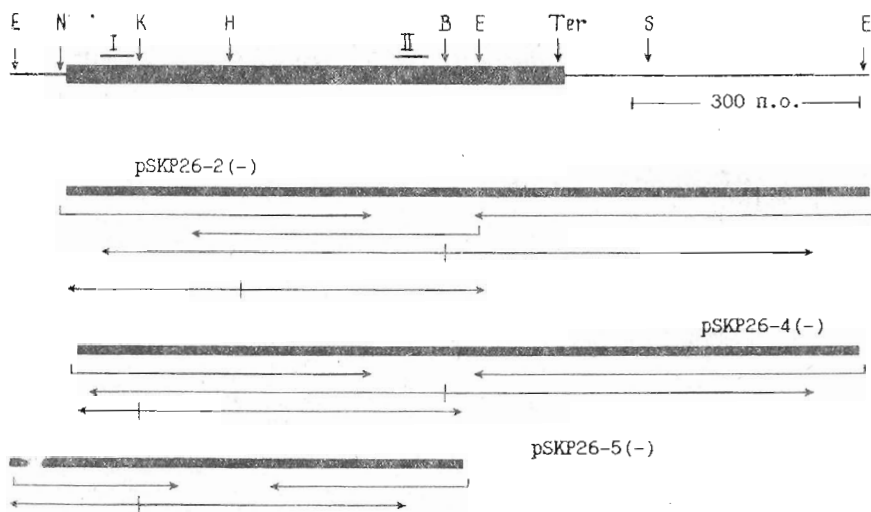


Рис. 2. Локализация вставок из выделенных клонов на рестриктной карте кДНК Р26 и стратегия определения нуклеотидной последовательности. Черным прямоугольником выделена кодирующая область. Стрелками под отметками кДНК показаны направления и протяженность секвенирования. В — *EcoRI*, Н — *HindIII*, К — *KpnI*, N — *NcoI*, S — *SmaI*. I и II обозначают положение нуклеотидных зондов, использованных для скрининга библиотеки кДНК

очищали методом ВЭЖХ на колонках с обращенной фазой. Автоматическим секвенированием по методу Эдмана были определены полные либо частичные аминокислотные последовательности восьми пептидов, заключающие в себе около 60% полипептидной цепи; все они подчеркнуты на рис. 3 (см. ниже).

Олигонуклеотиды* (5')AACACCAAGTTCACCGAGGAGG·AGCT (I) и (5')CACCTCCCCGAGGACGAGAACACCCC (II), соответствующие пептидам Asn-Thr-Lys-Phe-Thr-Glu-Glu-Glu-Leu (1) и His-Leu-Pro-Glu-Asp-Glu-Asn-Thr-Pro (2), были синтезированы на основании данных по частоте встречаемости кодонов в клонированных ранее кДНК нескольких известных белков НСП сетчатки быка и использовались в качестве гибридизационных зондов для скрининга библиотеки кДНК в бактериофаге λZAP. Среди $1 \cdot 10^8$ клонов библиотеки были найдены пять, давшие положительный сигнал гибридизации. Три из них: pSKP26-2(-), pSKP26-4(-) и pSKP26-5(-) использовались для определения нуклеотидных последовательностей клонированных вставок (рис. 2).

Результаты определения нуклеотидной последовательности показали, что ни один из обнаруженных клонов не содержал полноразмерной кДНК Р26. Во вставках из первых двух клонов отсутствовали несколько пар оснований 5'-кодирующей последовательности, но эти вставки содержали всю остальную кодирующую последовательность вместе с 3'-нетранслируемой областью, включая сигнал полиаденилирования (AATAAA) и poly(A)-последовательность через 17 пар оснований после этого сигнала. Напротив, в третьем клоне отсутствовало 90 пар оснований кодирующей области со стороны 3'-конца, но он содержал 61 пару оснований 5'-нетранслируемой области мРНК.

На рис. 3 представлена нуклеотидная последовательность кДНК Р26. Все полные и частичные аминокислотные последовательности, определенные при анализе пептидов Р26, кодировались этой последовательностью кДНК в одной рамке считывания. Триплет ATG (62-64)

* Префикс «d» (дезокс) здесь и в дальнейшем опущен.

1 gacccattgtctcccatccaccagcagtgatgacccggccgggcccacaccacctcacc
 62 ATGGGGAACAGCAAGAGTGGGGCCCTGTCCAAGGAGATCCTGGAGGAGCTGCAGCTGAAC
 1 M G N S K S G A L S K E I L E E L Q L N
 122 ACCAAGTTCACGGAGGAGGAGCTGAGCTCCTGGTAACCAGTCCTTCCTGAAGGAGTGCCCC
 21 T K F T E E \downarrow E L S S W Y Q S F L K E C P
 182 AGTGGCCGGATCACCCGGCAGGAGTTCAGACCATCTACTCCAAGTTCCTTCCTCCCGGAGGCC
 41 S G R I T R Q E F Q T I Y S K \downarrow F F P E A
 242 GACCCCAAGGCCTATGCCAGCACGTGTTCCGAAGCTTTGATGCCAACAGCGATGGCACC
 61 D P K A \downarrow Y A Q H V F R S F D A N S D G T
 302 TTGGAATCAAGGAGTATGTCATCGCCCTACACATGACCAGCGCGGGCAAGACCAACCAG
 81 L D F K E Y V I A L H M T \downarrow S A G K T N Q
 362 AAGCTGGACTGGGCCTTCTCCCTCTATGATGTGGATGGCAATGGGACCATCAGCAAGAAC
 101 \downarrow K L E W A F S L Y D V D G N G T I S K N
 422 GAGGTGCTGCAGATTGTCACGGCTATCTTCAAAATGATCAGCCCTGAGGACACAAAGCAT
 121 E V L E I V T A I \downarrow F K M I S P E D T K H
 482 CTCCAGAAGACGAGAACA CTCCGAAAAGCGAGCAGAGAAGATCTGGGGATTCTTTGGC
 141 L P E D E N T P E K R A E K I W G F F G
 542 AAGAAGGATGATGATAAACTTACAGAGAAAGAATTCATCGAAGGGACCCCTGGCCAATAAG
 161 K K D D D K L T E K E F I E G T L A N K
 602 GAAATCTGCGACTGATTCAATTCGAGCCTCAAAAAGTGAAGGAGAAA CTGAAGGAAAAAG
 181 E I L R L I Q F E P Q K V K E K L K E K
 662 AAACCTGA tgtaactgtcagggtctctctcctccccaccctctcaataaac
 201 K L Ter
 717 acacttgtgcacgcatgtgcacgcacacacacacaccgccccggggccgggaggggcc
 777 tccaaccacagcacattaaccctcctgcacacctcctgccaaacggaagtgtcgta
 837 agctattcaccagctcccgccactatactgcccgcctccccccccagcccgccagc
 897 ccaggcctccgtaataattccaggattaggtcacaggagccctaaatataggtcactgga
 957 gccctaaatatccccgccccatgtaagctcctttgtggattgttgggtaagcaggttcc
 1017 aataatgcaagaggagccgggcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1058

Рис. 3. Нуклеотидная и выведенная аминокислотная последовательности P26 из сетчатки быка. Подчеркнуты последовательности, определенные методами белковой химии, а также сигнал полиадеинирования. Стрелками обозначены EF-последовательности (см. текст). Ter — сигнал терминации трансляции. Строчными буквами обозначены нетранслируемые 5'- и 3'-области кДНК P26

является инициирующим кодоном, поскольку это первый ATG-кодон нуклеотидной цепи, следующий после нонсенс-кодона TGA (32–34) в той же рамке считывания, что и полипептидная цепь P26. За кодоном STC (665–667), кодирующим остаток Leu, следует кодон терминации TGA (668–670). Таким образом, аминокислотная последовательность P26, соответствующая нуклеотидной последовательности кДНК, состоит из 202 аминокислотных остатков, что соответствует молекулярной массе

23,3 кДа. В настоящее время мы выясним, подвергается ли P26 процессингу, а также природу модификации N-концевого остатка.

Недавно методами белковой химии была определена аминокислотная последовательность кальцийсвязывающего белка из сетчатки быка, названного рековерином [18]. Приведенная в этой работе аминокислотная последовательность рековерина полностью совпадает с нашими данными по первичной структуре P26, однако данные по нуклеотидной последовательности соответствующей полноразмерной кДНК рековерина в работе [18] не были приведены. Клонированная же нами кДНК белка P26 позволяет вести дальнейшие структурно-функциональные исследования этого белка с использованием методов генетической инженерии.

Скрининг по банку белковых структур NBFR-PIR показал, что некоторые пептиды P26 имеют значительное структурное сходство с участками аминокислотной последовательности тропонина С — витамин-D-зависимого кальцийсвязывающего белка сетчатки цыплят, а также кальмодулинов. Наивысшая степень подобия P26 наблюдается с визинином — кальцийсвязывающим белком, специфичным для колбочек сетчатки цыплят и для шишковидной железы (так называемого «третьего глаза») [19]. Принимая во внимание светозависимое возрастание уровня экспрессии визинина в шишковидной железе и в культуре клеток шишковидной железы, было предположено, что этот белок вовлечен в механизм фототрансдукции в колбочках и клетках шишковидной железы [19]. Аминокислотные последовательности визинина (192 аминокислотных остатка) и P26 имеют степень подобия 59%; наименьшая вариабельность наблюдается в центральных частях (с 65-го по 125-й остаток) соответствующих полипептидных цепей.

Как визинин, так и P26 содержат три кальцийсвязывающие последовательности (так называемые EF-последовательности [20]), на рис. 3 они выделены стрелками. Согласно критериям, приведенным в работе [20], каждая EF-последовательность включает в себя 29 аминокислотных остатков, образующих две α -спирали, между которыми находятся аминокислотные остатки, боковые группы которых участвуют в образовании координационных связей с ионом Ca^{2+} . В случае P26 по сравнению с канонической EF-последовательностью, приведенной в работе [20], имеется дополнительный остаток цистеина в положении 39. Можно предположить, что этот добавочный остаток цистеина служит для уменьшения кальцийсвязывающего потенциала первой EF-последовательности и обеспечения, таким образом, тонкой регуляции некой неизвестной функции. В любом случае этот остаток цистеина может в дальнейшем служить хорошим объектом для направленного мутагенеза.

Было показано, что рековерин (или P26) активирует гуанилатциклазу НСП, когда концентрация свободного Ca^{2+} снижается с 450 до 40 нМ [18]. Это соответствует прежним наблюдениям, согласно которым снижение концентрации Ca^{2+} увеличивает активность гуанилатциклазы во время фазы темновой адаптации [7].

Кальцийсвязывающий белок сетчатки может также выполнять и другие функции. В этой связи заслуживают внимания два следующих недавних наблюдения. Во-первых, из НСП лягушки был выделен кальцийсвязывающий белок с молекулярной массой 26 кДа [14], подобный визинину цыплят. Было показано, что этот белок, названный S-модулином, в присутствии 1 мкМ Ca^{2+} повышает эффективность активации ФДЭ на 50%, не изменяя ее максимальной активности. В отсутствие S-модулина на активацию ФДЭ не влияют сколько-нибудь значительно ни низкая (30 нМ), ни высокая (1 мкМ) концентрации Ca^{2+} . Было бы интересно выяснить, являются ли S-модулин и P26 регуляторами соответственно для ФДЭ и гуанилатциклазы, или же каждый из этих белков обладает

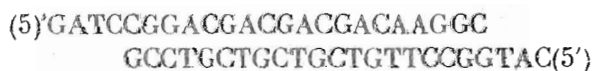
регуляторным действием для обоих ферментов. Во-вторых, сыворотка крови раковых больных с синдромом ретинопатии (CAR — cancer-associated retinopathy) дает положительную иммунохимическую кросс-реакцию с белком молекулярной массы 26 кДа из сетчатки человека [16]. Сравнение аминокислотных последовательностей показывает, что CAR-антиген является тем же белком, что и P26.

С учетом всего сказанного изучение P26 необходимо для детального понимания основ зрительного процесса и болезней сетчатки. Доступность кДНК P26 открывает широкие перспективы для дальнейших структурно-функциональных исследований этого белка с использованием методов генетической инженерии. В качестве первого шага в этом направлении мы экспрессировали P26 в *E. coli* в виде химерного белка ((фрагмент белка А из *Staphylococcus aureus*)-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-Ala-P26).

Ранее было показано, что вектор, содержащий полную кодирующую последовательность белка А, может быть успешно использован для экспрессии различных белков и пептидов [21, 22]. Более того, был синтезирован фрагмент ДНК, кодирующий участок связывания IgG в белке А, белковый продукт которого оказался столь же эффективен в этом связывании, как и целый белок А [23]. Следует отметить, что этот синтетический фрагмент был построен таким образом, что он содержал сигнальную последовательность, обеспечивающую секрецию гибридного белка; кроме того, была учтена частота встречаемости кодонов у *E. coli*. На основании этих принципов была сконструирована плазида *puCL2* для экспрессии в *E. coli* [23].

Для получения химеры фрагмента белка А и белка P26 из экспрессирующей векторной плазмиды *puCL2* [23] удаляли полилинкерный участок *BamHI-StuI*. Полноразмерную кодирующую область кДНК белка P26 собирали из двух клонированных фрагментов. Плазмиду *pSKP26-5* (-) расщепляли по сайтам *NcoI* и *BglII* для образования 5'-концевого фрагмента кДНК. Для образования 3'-концевого фрагмента кДНК белка P26 другую плазмиду, *pSKP26-4* (-), обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *BglII* и *SmaI*. Этот фрагмент после выделения дефосфорилировали бактериальной щелочной фосфатазой (ВАР), что позволило при проведении конечной реакции лигирования избежать образования побочных продуктов.

Чтобы обеспечить соединение между сайтами *BamHI* и *NcoI*, а также для образования последовательности, кодирующей фрагмент -Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-, который специфически распознается энтеропептидазой и расщепляется по связи Lys-X [24], были синтезированы олигонуклеотидные линкеры:



Непосредственно перед иницирующим кодоном P26 был добавлен кодон аланина для сохранения как рамки считывания, так и *NcoI*-сайта. Лигирование вектора *BamHI-StuI*, гетеродуплекса *BamHI-NcoI* и двух фрагментов кДНК P26 с использованием T4-ДНК-лигазы привело к получению плазмиды *pL2P26*, содержащей полноразмерную кДНК P26 (рис. 4).

Полученной плазмидой *pL2P26* были трансформированы клетки *E. coli* (штамм МН-1), затем *lac*-промотор индуцировали IPTG, после чего клетки инкубировали при температуре теплового шока (42° С) для облегчения секреции гибридного белка. Как и ожидалось, согласно электрофорезу в SDS-ПААГ, гибридный белок был в основном представлен в супернатанте.

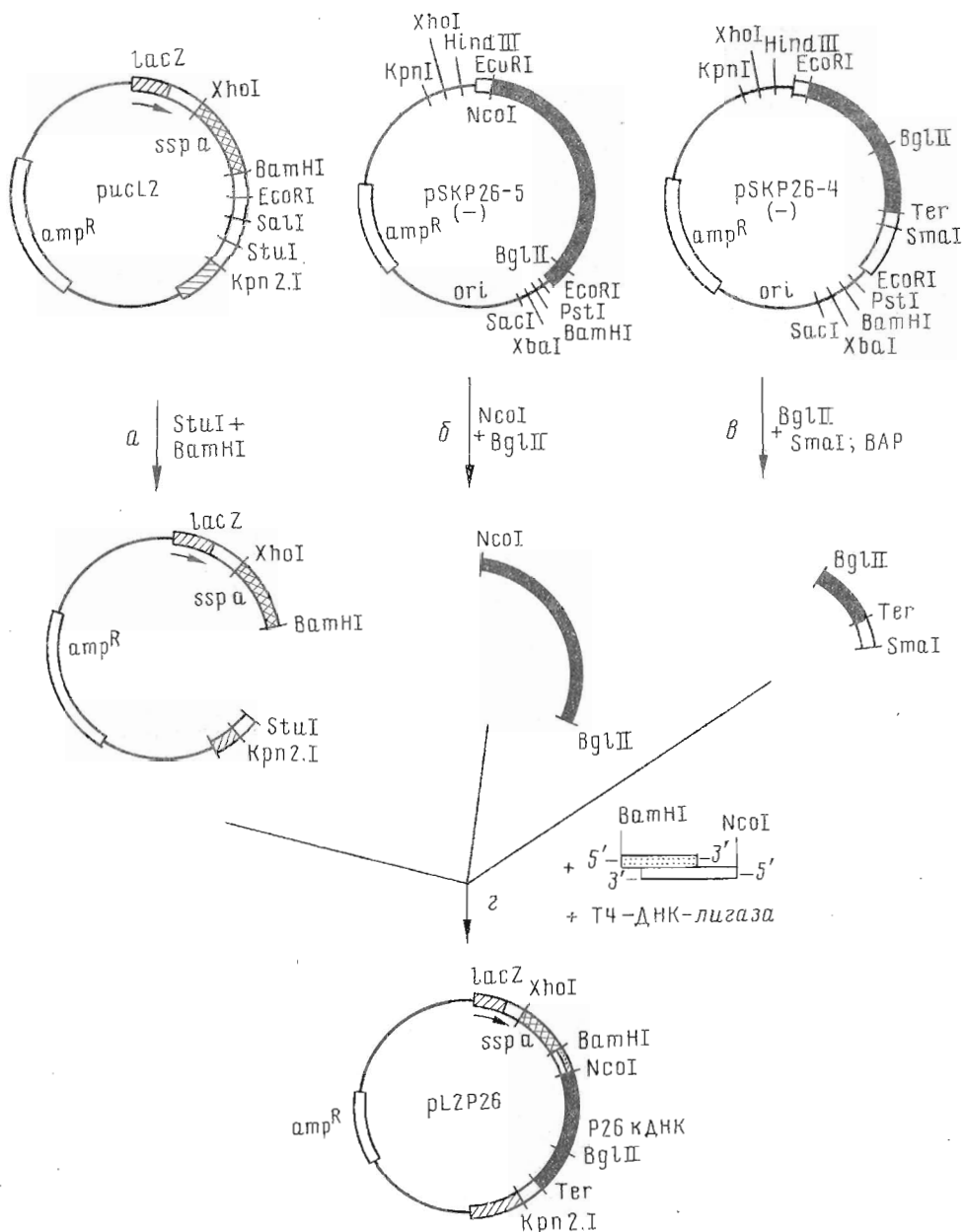


Рис. 4. Конструирование экспрессирующей плазмиды, содержащей кДНК P26: а - фрагмент *Bam*HI-*Stu*I удален из pucL2; б, в - фрагменты *Nco*I-*Bgl*II и *Bgl*II-*Sma*I выделены из pSKP26-5(-) и pSKP26-4(-) соответственно; з - вектор, два фрагмента и гетеродуплекс *Bam*HI-*Nco*I лигированы, что привело к образованию плазмиды pL2P26

Таким образом, химерный белок содержал IgG-связывающий участок, что облегчило его очистку методом аффинной хроматографии на IgG-сепарозе. SDS-электрофорез показал, что другие белки не связываются с аффинной колонкой и гибридный белок не нуждается в дальнейшей очистке (рис. 5). При более высокой нагрузке на дорожку полиакриламидного геля можно наблюдать слабо окрашиваемую полосу более высокой молекулярной массы (на рисунке не показано). Вероятнее всего,

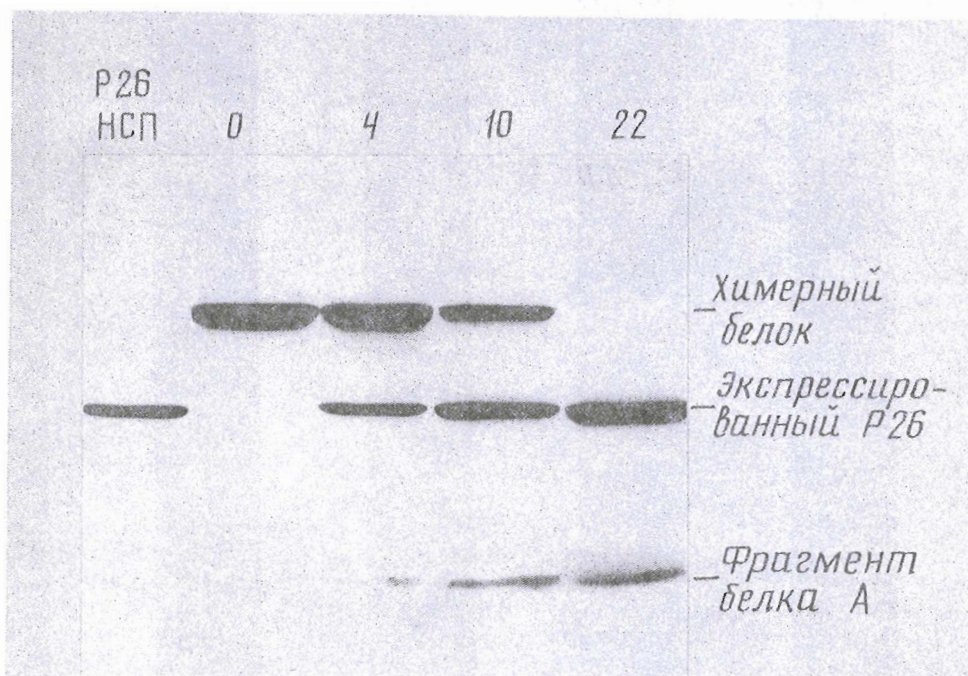


Рис. 5. SDS-электрофорез, показывающий образование P26 при расщеплении экспрессированного химерного белка энтеропептидазой. Указано время протеолиза: 0, 4, 10 и 22 ч

эта полоса принадлежит иммуноглобулинам с аффинной колонки, которые составляют не более 1–2% от химерного белка. Согласно предварительным данным, около 5–10% экспрессированного гибридного белка остается в клетках *E. coli*.

Химерный белок был подвергнут протеолизу энтеропептидазой по связи Lys-Ala в последовательности Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-Ala, примыкающей к N-концевой последовательности P26 в химерном белке. Время протеолиза контролировали SDS-электрофорезом. На рис. 5 можно видеть постепенное (время протеолиза от 0 до 22 ч) исчезновение химерного белка и появление полос фрагмента белка А и P26. Для окончательной очистки P26 применялась либо повторная аффинная хроматография на IgG-сефарозе, либо хроматография на колонке с Mono Q.

Целый ряд фактов свидетельствует о сходстве свойств экспрессированного и природного P26. Во-первых, электрофоретические подвижности природного и экспрессированного P26 идентичны (рис. 6б). Во-вторых, для обоих белков характерно сходное поведение при ионообменной хроматографии на колонке с Mono Q, что может свидетельствовать в пользу сходной конформации обоих белков (рис. 6а); вследствие этого нет необходимости специально ренатурировать экспрессированный P26. В-третьих, 10 циклов автоматической деградации по Эдману экспрессированного P26 не выявили отличий от установленной аминокислотной последовательности природного P26, за исключением N-концевого остатка аланина, введенного в адаптерный пептид экспрессированного белка. Наконец, авторадиграфия экспрессированного P26, перенесенного на нитроцеллюлозу, показала, что полоса, связывающая $^{45}\text{Ca}^{2+}$, совпадает с таковой в случае природного P26 (рис. 6б).

Преимуществами использованной нами системы экспрессии являются

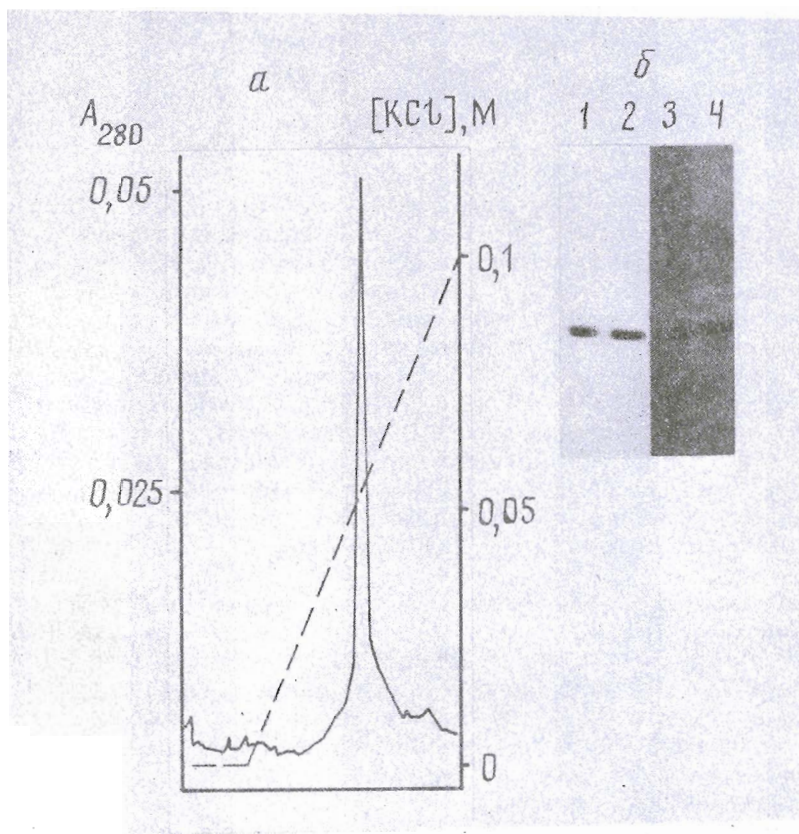


Рис. 6. Сравнение P26 из НСП и экспрессированного в *E. coli*. Профиль ионообменной хроматографии на колонке с Mono Q смеси равных количеств этих белков (а); электрофоретические подвижности P26 из НСП (1, 3) и экспрессированного P26 (2, 4) (б). 1, 2 – окрашивание кумасси R-250; 3, 4 – связывание $^{45}\text{Ca}^{2+}$ («кальциевый» блот)

легкость выделения экспрессированного химерного белка аффинной хроматографией на IgG-сефарозе, специфичность отщепления P26 энтеропептидазой и простота дальнейшей очистки отщепленного P26 повторной аффинной хроматографией, а также достаточно высокий выход экспрессированного белка. Разработка эффективной экспрессирующей системы, продуцирующей более 25 мг очищенного химерного белка на 1 л супернатанта, расширяет возможности для дальнейших структурно-функциональных исследований P26, в том числе позволяет использовать метод направленного мутагенеза. В настоящее время мы получили несколько мутантов P26, содержащих делеции или изменения в первичной структуре и проводим их функциональное изучение.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Института биоорганической химии РАН (Москва): проф. В. К. Антонову – за предоставление энтеропептидазы (энтерокиназы [24]); проф. В. П. Зубову – за синтез фторосорба [25]; д-ру хим. наук В. А. Ефимову – за плазмиду *pusL2*; канд. хим. наук Н. Б. Левиной – за помощь в секвенировании пептидов; канд. хим. наук Н. С. Быстрову – за синтез олигонуклеотидных зондов, а также д-ру М. Ашлберри (Department of Ophthalmology, University Chicago, USA) – за предоставленную библиотеку кДНК из сетчатки быка в бактериофаге λ ZAP.

Экспериментальная часть

В работе использовали: акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, персульфат аммония, N,N,N',N'-тетраметиленадидин, додецилсульфат натрия (SDS), β -меркаптоэтанол, набор белков-маркеров для электрофореза (LMW-Kit) (Bio-Rad, США); ацетонитрил (артикул 30), трис(гидроксиметил)аминометан(трис), муравьиную кислоту (Merck, ФРГ); бромциан (Pierce, США); изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (IPTG), Na₂-EDTA, ампициллин (Serva, ФРГ); кумасси R-250 (Sigma, США); кластринаин (Worthington, США); лаурилдиметиламинооксид (ЛДАО, 30% раствор), октил- β -D-глюкопиранозид (октилглюкозид), N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновая кислота) (HEPES; Fluka, Швейцария); триптон, дрожжевой экстракт, бакто-агар (Difco, США); SopA-сефарозу, IgG-сефарозу 6FF, сефадекс G-50 (Pharmacia, Швеция); эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI, *Stu*I, *Nco*I, *Bgl*II, *Sma*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Xba*I, *Xho*I, ДНК-лигазу фага T4, полинуклеотидкиназу фага T4, щелочную фосфатазу *E. coli* (BAP) (Boehringer Mannheim, ФРГ).

Дистиллированная вода дополнительно очищалась с помощью системы Milli-Q (Millipore, США). Все остальные реагенты имели квалификацию ос. ч.

Выделение P26. НСП выделяли из сетчаток быка согласно [26]. Фракцию растворимых белков получали ресуспендированием НСП из 300 сетчаток в 200 мл 20 мМ HEPES, pH 7,2, содержащего 1 мМ EDTA и 100 мМ NaCl, и последующим центрифугированием при 29 000 г в течение 1,5 ч (ротор Ti-19). Выделение НСП и экстракцию растворимых белков проводили при темно-красном освещении при 4° С. Супернатант концентрировали на ультрафильтрационной ячейке с фильтром Amicon PM-10, диализовали против 1,5 л буфера А (50 мМ трис-HCl, pH 7,4, содержащий 1 мМ CaCl₂ и 100 мМ NaCl) и наносили на колонку с фторосорбom (0,5×10 см). Перед нанесением образца колонку промывали 15 мл 0,1% раствора BSA, а затем уравнивали буфером А. Экстракт НСП наносили на колонку и промывали буфером А до возвращения A₂₈₀ к базовой линии. Затем колонку уравнивали буфером Б (20 мМ трис-HCl, pH 8,0, содержащий 1 мМ EDTA и 1% октилглюкозид). Окончательную очистку P26 проводили на колонке Mono Q HR 5/5 (Pharmacia, Швеция), уравниваемой 20 мМ трис-HCl, pH 8,0, с 1 мМ EDTA. Для элюции белков использовали линейный градиент концентрации KCl (0–200 мМ) при скорости потока 0,5 мл/мин. Аликвоты по 20 мкл анализировали SDS-электрофорезом по Лэмбли в градиенте ПААГ от 4 до 30% с последующим окрашиванием кумасси R-250 в 10% уксусной кислоте.

Расщепление P26 бромцианом, гидролиз кластринаином и выделение полученных пептидов. Очищенный P26 расщепляли 100-кратным мольным избытком бромциана в расчете на моль остатков метионина в 50% CF₃COOH в течение 24 ч при 20° С. Пептиды разделяли методом ВЭЖХ на колонках с обращенной фазой (Zorbax C8; C18) на хроматографе Altex, модель 332 (Altex, США) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0–80%) в 0,1% CF₃COOH. Протеолиз P26 кластринаином проводили при соотношении фермент-субстрат 1:50 в растворе, содержащем 100 мМ бикарбонат аммония (pH 7,7), 1 мМ дитиотреит, в течение 16 ч при 20° С. Полученную смесь пептидов разделяли методом ВЭЖХ, как указано выше.

Нуклеотидные последовательности определяли по методу Максама — Гилберта в твердофазном варианте, описанном в работе [27]. Работу с ДНК проводили стандартными методами [28].

Клонирование и экспрессия гена P26. Для экспрессии гена P26 при-

менялась система, описанная в работе [23]. кДНК P26 была реконструирована из двух вставок плазмид pSKP26-5(-) и pSKP26-4(-), что позволило получить плазмиду pL2P26 (см. рис. 4). Для экспрессии химерного белка плазмиду pL2P26 трансформировали в *E. coli* (штамм МН-1) и единичной колонией заражали 5 мл среды LB, содержащей 50 мкг/мл ампициллина. Культуру выращивали в течение ночи при 37° С. Ночную культуру (50–100 мкл) переносили в 200 мл среды LB с ампициллином (50 мкг/мл) и выращивали при 37° С и интенсивной аэрации, пока оптическое поглощение A_{600} не достигало значений 0,8–1,0. Затем добавляли индуктор *lac*-оперона IPTG (1 мМ) и инкубацию продолжали в течение ночи, вслед за чем следовала инкубация в течение 3 ч при 42–44° С. Клетки осаждали центрифугированием и хранили при –70° С, а супернатант использовали для выделения гибридного белка.

Для очистки химерного белка к супернатанту после осаждения клеток добавляли разбавленную HCl до pH 7,4 и раствор наносили при скорости потока 3 мл/мин на колонку с IgG-сефарозой 6FF (2,5×3 см). IgG-сефарозу 6FF предварительно обрабатывали согласно инструкции производителя. Химерный белок элюировали при той же скорости потока 0,5 М ацетатом аммония, pH 3,4, и переводили в 10 мМ трис-HCl, pH 7,4, на колонке (2,5×40 см) с сефадексом G-50.

Расщепление химерного белка энтеропептидазой по связи Lys-X проводили согласно работе [24]. Экспрессированный P26, полученный после расщепления химерного белка энтеропептидазой, очищали от фрагмента белка А аффинной хроматографией на IgG-сефарозе 6FF при указанных выше условиях.

Анализ связывания Ca^{2+} проводили как описано в работе [29].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yan K. W., Nakatani K. // Nature. 1984. V. 309. № 5966. P. 352–354.
2. Cervetto L., Lagnado L., Perry R. J., Robinson D. W., McNaughton P. A. // Nature. 1989. V. 337. № 6209. P. 740–743.
3. Yan K. W., Nakatani K. // Nature. 1985. V. 313. № 6003. P. 579–582.
4. Matthews H. R., Murphy Rl. M., Fain G. L., Lamb T. D. // Nature. 1988. V. 334. № 6177. P. 67–69.
5. Nakatani K., Yan K. W. // Nature. 1988. V. 334. № 6177. P. 69–71.
6. Pugh E. N. (Jr.), Lamb T. D. // Vision Res. 1990. V. 30. № 12. P. 1923–1948.
7. Hodgkin A. L., Nunn B. J. // J. Physiol. 1988. V. 403. № 2. P. 439–471.
8. Rispoli G., Sather W. A., Detwiler P. B. // Biophys. J. 1988. V. 53. № 2. P. 388a.
9. Kawamura S., Murakami M. // J. Gen. Physiol. 1989. V. 94. № 3. P. 649–668.
10. Pepe J. M., Panfoli J., Cugnoli C. // FEBS Lett. 1986. V. 203. № 1. P. 73–76.
11. Koch K. W., Stryer L. // Nature. 1988. V. 334. № 6177. P. 64–66.
12. Robinson P. R., Kawamura S., Abramson B., Bownds M. D. // J. Gen. Physiol. 1980. V. 76. № 3. P. 631–645.
13. Barkdoll A. E., Pugh E. N., Sitaramayya A. // J. Gen. Physiol. 1989. V. 93. № 5. P. 1091–1108.
14. Kawamura S., Murakami M. // Nature. 1991. V. 349. № 6308. P. 420–423.
15. Dizhoor A. M., Nekrasova E. R., Philipov P. P. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989. V. 162. № 1. P. 544–549.
16. Polans A. S., Buczylo J., Crabb J., Polczewski K. // J. Cell. Biol. 1991. V. 112. № 5. P. 981–989.
17. Lambrecht H.-G., Koch K. W. // EMBO J. 1991. V. 10. № 4. P. 793–798.
18. Dizhoor A. M., Ray S., Kumar S., Niem C., Spengler M., Brolley D., Walsh K., Philipov P. P., Hurley J., Stryer L. // Science. 1991. V. 251. № 4996. P. 915–918.
19. Yamagata K., Goto K., Kuo Ch.-H., Kondo H., Niki N. // Neuron. 1990. V. 2. № 7. P. 469–476.
20. Moncrief N. D., Kretsinger R. H., Goodman M. // J. Mol. Evol. 1990. V. 30. № 6. P. 522–562.
21. Uhlen M., Nilsson B., Guss B., Lindberg M., Gatenbeck S., Philipson L. // Gene. 1983. V. 23. № 3. P. 369–378.
22. Moks T., Abrahamsen L., Nilson B., Hellman U., Sjoquist J., Uhlen M. // Eur. J. Biochem. 1986. V. 156. № 3. P. 637–643.

23. Ефимов В. А., Бурякова А. А., Полушин Н. Н., Пашкова И. Н., Дмитрикова Е. В., Чазмазцева О. Г. // Биоорганич. химия. 1989. Т. 15. № 4. С. 499-507.
24. Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф., Филиппов С. А., Чувпило С. А., Коробко В. Г., Воротынцева Т. Н., Бессмертная Л. Я., Михайлова А. Г., Америк А. Ю., Антонов В. К. // Биоорганич. химия. 1987. Т. 13. № 1. С. 119-121.
25. Сабуров В. В., Муетдинов М. Р., Гурьянов С. А., Катаев А. Д., Туркин С. И., Зубов В. П. // V Всесоюзный симпозиум по молекулярной жидкостной хроматографии. Тезисы докладов. Рига, 1990. С. 207.
26. Uhl R., Desel H., Ryba N., Wagner R. // J. Biochem. Biophys. Methods. 1987. V. 14. № 3. P. 127-138.
27. Chuvpilo S. A., Kravchenko V. V. // FEBS Lett. 1984. V. 179. № 1. P. 34-36.
28. Маниагис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
29. Maruyama K., Mikawa T., Ebashi S. // J. Biochem. 1984. V. 95. № 2. P. 511-519.

Поступила в редакцию
25.X.1994

M. A. KUTUZOV, B. E. SHMUKLER, O. N. SUSLOV,
A. A. ZARGAROV, N. G. ABDULAEV

**P26 — A CALCIUM BINDING PROTEIN FROM BOVINE RETINAL
PHOTORECEPTOR CELLS: PRIMARY STRUCTURE AND
EXPRESSION IN *E. coli***

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow*

The primary structure of the bovine retinal calcium binding protein P26 has been determined by the parallel analysis of the protein and the corresponding cDNA. This protein is identical to recoverin and shares 59% homology with visinin, a cone specific calcium binding protein from chicken retina. P26 was expressed in *E. coli* as a fusion protein and, after purification by affinity chromatography on IgG-Sepharose 6, cleaved off with enteropeptidase.