



УДК 577.(217.5+336)

СТАБИЛИЗИРОВАННАЯ РЕАКЦИОННАЯ СМЕСЬ ДЛЯ ТРАНСЛЯЦИИ мРНК *in vitro*

© 1998 г. Л. А. Шалойко, А. Ю. Гороховатский, Е. Е. Максимов*, Ю. Б. Алахов[#]

Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
142292, г. Пущино Московской области;

* Институт биохимии и молекулярной биологии, Технический университет, Берлин

Поступила в редакцию 12.11.97 г. Принята к печати 05.01.98 г.

Описан метод получения готовой к использованию стабилизированной реакционной смеси для трансляции мРНК *in vitro*. Показана возможность стабилизации лиофильным высушиванием в присутствии различных сахаров полной трансляционной смеси, содержащей экстракт зародышей пшеницы, аминокислоты, АТР, ГТР, креатинфосфат, креатинкиназу, реакционный буфер. Лучший стабилизирующий эффект обеспечивает присутствие 10% (вес/объем) трегалозы, которая также обладает уникальным свойством действовать как активатор трансляции. Трегалоза увеличивает выход продукта трансляции и повышает эффективность трансляции различных мРНК. Леофильно высушенная полная трансляционная смесь, содержащая трегалозу, может храниться при 4–8°C в течение нескольких месяцев без потери активности и легко реконструируется добавлением водного раствора мРНК, обеспечивая воспроизводимые результаты. Это дает возможность использовать бесклеточную систему трансляции в качестве аналитического средства для скрининга широкого класса веществ, ингибирующих процесс трансляции на различных его этапах.

Ключевые слова: трансляция, бесклеточная система; обелин, люминесценция; трегалоза.

Со времени первых публикаций [1–3] бесклеточная система трансляции на основе грубых клеточных экстрактов S-30 или S-100 из *Escherichia coli* претерпела лишь незначительные изменения [4, 5] и в настоящее время широко применяется в научных исследованиях. Кроме бесклеточных систем на основе бактериальных клеток для трансляции эукариотических матричных РНК используют лизаты многих клеточных культур и перевиваемых асцитных опухолей. Наибольшее распространение получили лизаты ретикулоцитов кролика и экстракты зародышей пшеницы [6, 7]. Бесклеточные системы позволяют не только изучать *in vitro* чисто фундаментальные проблемы, связанные с процессами биосинтеза белка, но и решать задачи прикладного характера. К такого рода задачам относится создание новых биотехнологий для получения рекомбинантных белков; оценка эффективности искусственных генных конструкций, кодирующих мутантные белки; разработка тест-систем, применимых в биологии, фармакологии, медицине и экологии для обнаружения биологически активных веществ. Однако все коммерчески доступные препараты бесклеточных систем, а также приготовленные в лабораторных условиях

обладают рядом принципиальных недостатков. Прежде всего это их нестабильность даже при низких температурах (–70°C); кроме того, плохая воспроизводимость результатов практически исключает применение бесклеточных систем в аналитических целях.

Хорошо известна способность растворов сахаров при замораживании переходить в стеклообразное состояние, являющаяся важным фактором в предотвращении повреждений биологических систем при высушивании, приводящих к потере биологической активности. Сравнительно недавно было показано [8, 9], что трегалоза благодаря набору уникальных свойств обладает значительными преимуществами перед другими сахарами для криоконсервации биологических систем. В данной работе проведено сравнительное исследование стабилизирующих свойств различных сахаров на функциональную активность бесклеточной системы трансляции из зародышей пшеницы и впервые показана возможность стабилизации этой системы лиофильным высушиванием.

В качестве тестовой матрицы контроля хода трансляции была выбрана мРНК Ca²⁺-активируемого фотобелка обелина. Синтез обелина в бесклеточной системе трансляции позволяет контролировать ход трансляции не только по включению радиоактивной метки, но и по люминесцентной реакции, которая инициируется при связывании бел-

[#] Автор для переписки (тел./факс: 007-0967-730653, e-mail: alakhov @ fibkh.serpukhov.su).

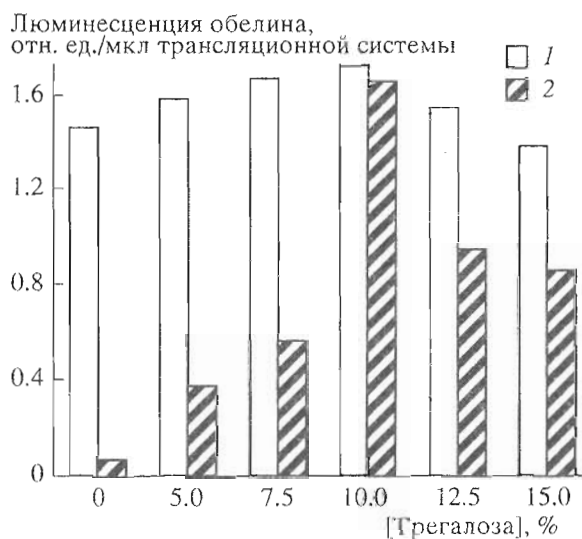


Рис. 1. Зависимость от концентрации трегалозы выхода обелина при трансляции в стандартной бесклеточной системе из зародышей пшеницы (1) и после регидратации лиофилизированной трансляционной системы (2).

ком ионов кальция в присутствии синтетического субстрата – целентеразина [10]. При исследовании влияния концентрации трегалозы на суммарный выход обелина в процессе трансляции в бесклеточной системе из зародышей пшеницы показано (рис. 1), что трегалоза в течение 2 ч не только не ингибирует синтез обелина, но, наоборот, происходит некоторая активация, достигающая максимума при 10% концентрации трегалозы. Дальнейшее повышение концентрации трегалозы приводит к снижению эффективности синтеза. Таким образом, добавление трегалозы к трансляционной смеси в количестве 10% (вес/объем) оптимально для наиболее эффективного хода трансляции.

Из всех других сахаров, исследованных в той же системе трансляции в тех же самых условиях (рис. 2), только трегалоза активирует синтез, а все остальные при концентрации 10% проявляют ингибирующее действие. Наибольшим ингибирующим эффектом обладает фикола, снижающий эффективность трансляции по отношению к действию трегалозы более чем в 3 раза. На рис. 2 представлены данные по эффективности трансляции обелина после лиофильного высушивания реакционной смеси в присутствии вышеупомянутых веществ. После регидратации реакционной смеси добавлением водного раствора мРНК обелина эффективность трансляции в присутствии трегалозы практически не изменяется, в то время как в присутствии других веществ наблюдается дальнейшее ингибирование эффективности трансляции (за исключением раффинозы), а присутствие фикола полностью ингибирует трансляцию.

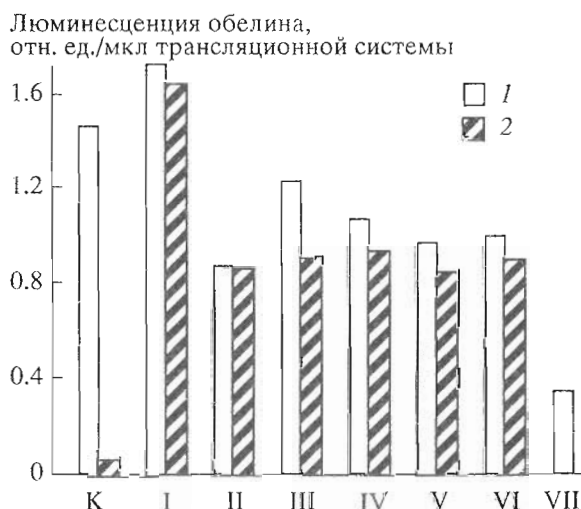


Рис. 2. Влияние присутствия трегалозы (I), раффинозы (II), сорбитола (III), сахарозы (IV), мальтотриозы (V), мальтозы (VI), фикола (VII) (10% вес/объем) на выход обелина при трансляции в бесклеточной системе из зародышей пшеницы без лиофилизации (1) и после лиофилизации (2); К – контроль.

Возникает вопрос: является ли активирующий эффект трегалозы уникальным для трансляции мРНК обелина или трегалоза активирует трансляцию самых разных мРНК? Для ответа на этот вопрос была проведена трансляция в присутствии 10%-ной трегалозы ряда других мРНК (мРНК N-концевого фрагмента фактора элонгации EF-2; химерной конструкции, состоящей из кДНК фрагмента А-белка и тетрамера саркотоксина 1А; мРНК дигидрофолатредуктазы). Выход продуктов трансляции определяли по включению [^{14}C]лейци-

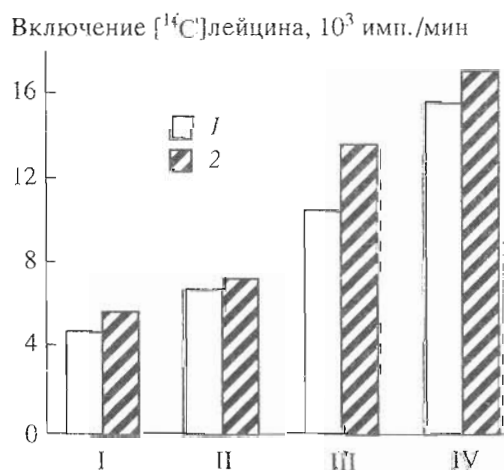


Рис. 3. Трансляция различных мРНК без трегалозы (1) и в присутствии 10%-ной трегалозы (2) для синтеза в бесклеточной системе трансляции N-концевого фрагмента фактора элонгации 2 (I), химерного белка (фрагмент А-белка – тетрамер саркотоксина 1А) (II), обелина (III), дигидрофолатредуктазы (IV).

на. Как в присутствии трегалозы, так и в ее отсутствие во всех исследованных случаях наблюдается (рис. 3) увеличение выхода продуктов трансляции. Добавление трегалозы изменяет также и кинетику синтеза данных белков, делая ее более эффективной (рис. 4).

Необходимо отметить, что при получении стабилизированной лиофильным высушиванием системы нужно учитывать некоторые обстоятельства. Стабилизирующий эффект трегалозы и других сахаров при консервации ранее был исследован на индивидуальных ферментах, белках и моноклональных антителах [11, 12]. В данной работе впервые проверена возможность стабилизации лиофильным высушиванием полной трансляционной системы, содержащей комплекс мультиферментных систем, включая весь аппарат трансляции. В отличие от индивидуальных белков дегидратированная трансляционная смесь должна быть реконструирована до исходного реакционного объема, чтобы исключить изменение исходной концентрации компонентов, важных для процесса трансляции, т.е. необходимо учитывать количество остающейся влаги в высушенном препарате. Это зависит в первую очередь от метода высушивания.

Высушивание трансляционной смеси без трегалозы приводит к образованию дегидратированного твердого остатка, нерастворимого в воде. Регидратация этого остатка дает мутную суспензию необратимо агрегированного материала, обладающего минимальной трансляционной активностью.

Данные измерения активности трансляционной системы после регидратации образцов, высушенных различными способами из различных объемов в присутствии 10%-ной трегалозы (таблица), свидетельствуют о том, что способ высушивания и метод замораживания реакционной смеси являются критическими факторами, определяющими эффективность сохранения трансляционной активности в ходе сушки. Наблюдаемая потеря трансляционной активности в больших реакционных объемах (50 и 100 мкл) после регидратации, по-видимому, обусловлена неполнотой дегидратирования. В итоге для ускорения процесса и

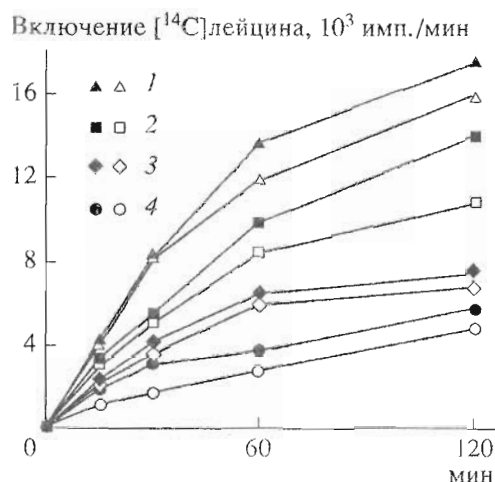


Рис. 4. Кинетика синтеза дигидрофолатредуктазы (1), обелина (2), химерного белка (фрагмент А-белка – тетрамер саркотоксина 1А) (3), N-концевого фрагмента фактора элонгации 2 (4) в бесклеточной системе трансляции без добавления (светлые знаки) и при добавлении (черные знаки) 10%-ной трегалозы.

повышения эффективности дегидратирования процедура вакуумной сушки была модифицирована. Для сушки были использованы микроцентрифужные пробирки с плоским дном объемом 2 мл для повышения соотношения поверхность/объем при дегидратации. Реакционную смесь замораживали в жидком азоте непосредственно перед лиофилизацией и процесс сушки продлевали до 3 ч. В результате после сушки образуется дегидратированный белый порошок, прекрасно растворимый в воде. Сухой порошок может быть растворен в объеме, равном объему реакционной смеси до высушивания, и реконструированная реакционная смесь восстанавливает исходную трансляционную активность практически полностью.

Полученная таким образом стабилизированная трансляционная система была испытана на способность сохранять трансляционную активность после хранения в течение длительного времени при разных температурах. После лиофилизации в присутствии 10%-ной трегалозы серия высушенных образцов хранилась до 90 сут при 4–8°C (холо-

Влияние режимов высушивания бесклеточной системы трансляции в присутствии 10%-ной трегалозы на ее активность

Способ высушивания	Метод замораживания	Активность реконструированной трансляционной системы (%) после высушивания из разных объемов*		
		25 мкл	50 мкл	100 мкл
В вакуумном центрифужном концентраторе	Без замораживания**	90	70	55
	В смеси сухой лед/этанол	100	80	75
Лиофилизация	В жидком азоте	100	100	100

* За 100% принимается трансляционная активность стандартной бесклеточной системы в присутствии 10%-ной трегалозы.

** Концентрирование из исходного жидкого состояния.



Рис. 5. Влияние температуры хранения лиофильно высушенной в присутствии 10%-ной трегалозы реакционной смеси на ее трансляционную способность. Заштрихованные столбики – 4–8°C, черные – 22–24°C.

дильник) и комнатной температуре (22–27°C). Периодически в образцах реакционной смеси измеряли трансляционную активность по выходу продукта трансляции мРНК обелина в стандартных условиях, измеряя люминесценцию синтезированного белка (рис. 5). Как видно из приведенных данных, активность трансляционной смеси при хранении при комнатной температуре сохраняется без изменения до 7 сут, а затем постепенно падает. При хранении образцов при 4–8°C активность системы сохраняется полностью до 90 сут.

Тот факт, что трегалоза обладает достаточно выраженным активирующим воздействием (в отличие от других сахаров и полиолов) на сложную мультиферментную систему, каковой является бесклеточная система трансляции (рис. 1, 2), по-видимому, обусловлен рядом уникальных свойств трегалозы [8].

Трехмерная организация практически всех биологических макромолекул в растворе зависит от укладки молекул воды, соединенной водородными связями с поверхностью биополимера. Углеводы могут замещать связанную воду, формируя новые водородные связи (water-replacement-гипотеза [13, 14]). В отличие от других дисахаридов трегалоза, не имея внутренних водородных связей, формирует четыре водородные связи с двумя молекулами воды, образуя часть нативной структуры дигидрата. Такое расположение водородных связей придает молекуле трегалозы необычную подвижность вокруг дисахаридной связи, что позволяет ей теснее взаимодействовать с нерегулярной поверхностью макромолекулы по сравнению с более жесткими структурами дисахаридов, соединенных водородными связями [8]. Трегалоза – один из наиболее стабильных сахаров. Энергия дисахаридной связи очень низка (менее 1 ккал/моль). Поскольку дисахаридная связь в трегалозе фор-

мируется между С1-атомами пиранозных колец, молекула не обладает гликозилирующими свойствами и не может модифицировать белки. Энергия дисахаридной связи другого невосстанавливающего дисахариды – сахарозы достаточно высока (27 ккал/моль), и, как следствие, она легко расщепляется под действием реактивных химических групп белков с образованием глюкозы и фруктозы. Оба моносахарида способны модифицировать биологически активные молекулы. Кроме того, стеклообразное состояние, в которое переходят сахароза или другие сахара при замораживании водных растворов, очень гигроскопично и, сорбируя воду, постепенно сменяется кристаллическим, повреждая при этом сложные биологические структуры. В отличие от других сахаров трегалоза переходит в негигроскопическое стеклообразное состояние.

Таким образом, набор перечисленных свойств делает трегалозу хорошим криоконсервирующим агентом, пригодным для стабилизации сложных биологических систем, и в данном случае позволяет использовать бесклеточную систему трансляции для разработки аналитических методов скрининга веществ, ингибирующих процесс трансляции на различных его этапах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы нуклеозидтрифосфаты, креатинфосфат, креатинкиназа, DTT (Boehringer, ФРГ); спермидин, соли, буферные компоненты, сахароза, трегалоза, мальтоза, мальтотриоза, раффиноза, сорбитол, фикола (Sigma, США); [¹⁴C]Leu (11,8 ГБк/ммоль; Amersham, Англия).

Рестрикционные эндонуклеазы и ДНК-лигаза фага T-4 получены от фирмы Fermentas (Литва), ДНК-полимераза I *E. coli* (фрагмент Кленова) – из Института цитологии и генетики (Новосибирск).

РНК-полимераза фага SP6 и РНК-полимераза фага T7 предоставлены проф. Н.И. Матвиенко (Институт белка, Пушино).

Плазмида pGEM1 с кодирующей последовательностью дигидрофолатредуктазы из *E. coli* предоставлена М.И. Колосовым (Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и медицины, Москва).

Плазмида pSP65 с кодирующей последовательностью N-концевого фрагмента фактора элонгации 2 (EF-2) из печени крыс (66 а. о.) и плазмида pSP64 с кодирующей последовательностью химерного белка, состоящего из фрагмента А-белка и тетрамера саркотоксина 1А, были получены в лаборатории организации белковых структур (ФИБХ, Пушино; данные не опубликованы).

мРНК обелина выделена из плазмиды pNOV [10].

Все транскрипты синтезированы и очищены по методике, описанной в работе [15].

Экстракт из зародышей пшеницы получен стандартным методом и характеризовался величиной A_{260} , равной 90 ОЕ [16].

Трансляция матричных РНК *in vitro*. Трансляционная смесь содержала 40 мМ НЕРЕС (рН 7.6), 3.2 мМ Mg(OAc)₂, 80 мМ КAc, 6 мМ DTT, 1 мМ ATP, 0.1 мМ GTP, 0.25 мМ спермидин, 8 мМ креатинфосфат, 60 мкг/мл креатинкиназы (350 ед. акт./мг), 20 аминокислот (100 мкМ каждая) (в случае, когда продукт трансляции метили [¹⁴C]Leu, смесь аминокислот не содержала лейцин). При трансляции в объеме 25 мкл добавляли 8 мкл экстракта из зародышей пшеницы и 1 мкг мРНК.

При увеличении объема трансляции соответственно увеличивали объем экстракта и количество мРНК.

Смесь для трансляции в присутствии сахаров содержала те же компоненты и указанные количества сахара или полиола. Трансляцию проводили 2 ч при 24°C.

Количество ¹⁴C-меченых продуктов трансляции было определено осаждением в трихлоруксусной кислоте по известной схеме [10].

Метод определения активного обелина по его люминесценции подробно описан в работе [17].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zubay G. // Ann. Rev. Gen. 1973. V. 7. P. 276–287.
2. Devries J., Zubay G. // J. Bacteriol. 1969. V. 97. P. 1119–1125.

3. Gold L.M., Schweiger M. // Methods Enzymol. 1971. V. 20. P. 537–542.
4. Collins J. // Gene. 1979. V. 6. P. 29–42.
5. Pratt J.M., Boulnois G.J., Darby V., Orr E., Wahle E., Holland I.B. // Nucleic Acids Res. 1981. V. 9. P. 4459–4474.
6. Clemons M. // Transcription and Translation / Eds B.D. Hames, S.J. Higgins. Oxford; Washington: IRL Press, 1984. P. 179–210.
7. Roberts B.E., Paterson B.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. P. 2330–2334.
8. Roser B. // BioPharmacology. 1991. V. 4(8). P. 47–53.
9. Roser B. // Trends Food Sci. Technol. 1991. V. 2(7). P. 166–169.
10. Matveev S.V., Illarionov B.A., Vysotskyi E.S., Bondar V.S., Markova S.V., Alakhov Yu.B. // Anal. Biochem. 1995. V. 231. P. 34–39.
11. Pikal M.J. // BioPharmacology. 1990. V. 3(8). P. 18–27.
12. Pikal M.J. // BioPharmacology. 1990. V. 3(9). P. 26–30.
13. Growe J.H., Growe L.M., Mouradian R. // Cryobiology. 1983. V. 20. P. 346–356.
14. Clegg J.S. // Membranes, Metabolism and Dry Organisms/ Ed. A.C. Leopold. Cornell University Press, 1986. P. 169–187.
15. Gurevich V.V., Pokrovskaya I.D., Obukhova T.A., Zozulya S.A. // Anal. Biochem. 1991. V. 231. P. 34–39.
16. Erikson A.H., Blobel G. // Methods Enzymol. 1983. V. 96. P. 38–50.
17. Matveev S.V., Vinokurov L.M., Shaloiko L.A., Davies C., Matveeva E.A., Alakhov Yu.B. // Biochim. Biophys. Acta. 1996. V. 1293. P. 207–212.

A Stabilized Reaction Mixture for *in vitro* Translation of mRNA

L. A. Shaloiko*, A. Yu. Gorokhovatskii*, E. E. Maksimov**, and Yu. B. Alakhov*[#]

*Pushchino Branch, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

**Institute of Biochemistry and Molecular Biology, The Technical University, Berlin, Germany

Here we describe a method for obtaining a ready-to-use stabilized reaction mixture for *in vitro* translation of mRNA. We also demonstrate the stabilization of a complete translation mixture containing wheat germ extract, amino acids, ATP, GTP, creatine phosphate, creatine kinase, and the reaction buffer by lyophilization in the presence of various sugars. The greatest stabilizing effect is achieved by supplementing the mixture with 10% (mass/volume) trehalose, which is also a unique translation activator, enhancing the translation of various mRNAs. A lyophilized complete translation mixture containing trehalose can be stored at 4–8°C for several months without losing its activity. The mixture can be easily reconstituted by adding an aqueous mRNA solution and retains the potential for reproducible functioning. This allows the employment of such a cell-free translation system for analytical screening of a broad spectrum of compounds inhibiting translation at various stages.

Key words: translation, cell-free system, obelin, luminescence, trehalose

[#] To whom correspondence should be addressed; phone/fax +7 (0967) 73-0653; e-mail: alakhov@fibkh.serpukhov.su.