

УДК 577. 217. 347

Т.В.Диденко (5 курс, каф. ЭФ), В.И.Катунин, к.б.н., с.н.с. (ОМРБ ПИЯФ РАН)

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА РНК-ЛИГАЗЫ БАКТЕРИОФАГА T4

В течение последних трех лет произошел феноменальный прогресс в кристаллографии рибосом. Были получены атомные структуры 30S субчастиц при разрешении менее 3.3\AA и целых рибосом при разрешении 5.8\AA [1]. В результате появилось гигантское количество информации, как о глобальной архитектуре и РНК-белковых взаимодействиях в каждой субчастице рибосомы, так и детали взаимодействия рибосомы с ее лигандами (факторами, мРНК и тРНК). Изменяя стабильность контактов между рибосомой и тРНК, можно выяснить вклад отдельных нуклеотидов рРНК во взаимодействие тРНК с А или Р сайтами рибосомы. Но до сих пор не решена проблема получения чистых препаратов рибосом с мутантными рибосомальными РНК. В качестве альтернативного метода можно вводить необходимые замены в тРНК.

В лаборатории биосинтеза белка планируется получить дрожжевую фенилаланиновую тРНК с заменами в 34 и 37 нуклеотидах, чтобы выяснить роль 1492 и 1493 нуклеотидов 16S тРНК, которые предположительно взаимодействуют с 34 и 37 нуклеотидами, образуя водородные связи с ОН группой во втором положении рибозы. Мы собираемся их заменить либо на дезоксирибонуклеотиды, либо на аналогичные, метилированные по второму положению рибозы.

Удобным методом, позволяющим вводить отдельные замены в антикодоновую петлю, является метод ферментативного замещения антикодоновой петли, предложенный Брюсом и Уленбеком [2]. Использование данного метода предполагает наличие достаточно чистых, не обладающих рибонуклеазной активностью ферментов РНК-лигазы бактериофага T4, нуклеотидилтрансферазы и полинуклеотидкиназы. Цель данной работы: клонирование гена РНК лигазы бактериофага T4, конструирование гена химерной РНК-лигазы бактериофага T4, содержащей последовательность из 6-ти гистидиновых аминокислотных остатков на С-конце, что необходимо для последующей хроматографической очистки белка с использованием Ni-NTA агарозы, экспрессия этого гена в системе рЕТ под контролем дерепрессированного промотора РНК полимеразы фага T7, последующее выделение и очистка белка.

Последовательность, кодирующая ген РНК-лигазы бактериофага T4, была амплифицирована с помощью ПЦР и снабжена концевыми сайтами рестрикции HindIII и NdeI. ПЦР продукт и экспрессионный вектор рЕТ21b, обработанные эндонуклеазами рестрикции HindIII и NdeI, лигировали, затем трансформировали полученной рекомбинантной плазмидой штамм DH5 α для получения клонов. Клоны отбирали на селективной среде с антибиотиком. Плазмидой, выделенной из полученных клонов, трансформировали штамм для экспрессии – BL21Gold(DE3), несущий в себе ген T7 РНК полимеразы, под контролем промотора lacUV5, который дерепрессируется IPTG. Была проведена индукция добавлением IPTG, лизат клеток изучили на наличие белковых фракций с помощью гель электрофореза в ПААГ с добавлением додецилсульфата натрия.

Результаты фореза показали, что после добавления IPTG в клетках начинает синтезироваться белок с мол. весом, аналогичным РНК-лигазе бактериофага T4. Проверка на наличие полигистидиновой последовательности была произведена путем инкубации клеточного лизата с Ni-NTA агарозой и ее последующим ступенчатым отмыванием различными концентрациями имидазола. Смывы также анализировались на гель электрофорезе в ПААГ с добавлением додецилсульфата натрия. На форезе было видно, что Ni-NTA агарозы смывается белок, молекулярный вес которого соответствовал T4 РНК лигазе. Чтобы окончательно проверить, какой белок экспрессируется, был проведен сиквенс

рекомбинантной плазмиды, результаты которого показали, что экспрессируется РНК-лигаза бактериофага Т4 с полигистидиновым трактом.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Stahl G., McCarty G.P., Farabaugh P.J (2002), Ribosome structure: revisiting the connection between translational accuracy and unconventional decoding. *Trends Biochem Sci.* 2002 Apr;27(4): 178-83.
2. Bruce A.G., Uhlenbeck O.C. (1982), Enzymatic Replacement of the Anticodon of Yeast Phenylalanine Transfer Ribonucleic Acid *Biochemistry* **21**, 855-861