

Применение спектрофлуориметра ChronosDFD с цифровой обработкой сигнала в частотной области (ISS, США) в биохимических исследованиях.

Аннотация статьи

COTRANSLATIONAL PROTEIN FOLDING WITHIN THE RIBOSOME TUNNEL INFLUENCES TRIGGER-FACTOR RECRUITMENT

Ku-Feng Lin, Chia-Sui Sun, Yi-Chen Huang, Sunney I. Chan, Jiri Koubek, Tzong-Huah Wu, Joseph J.-T. Huang.
Biophysical Journal, 2012, 102(12), 2818-27.

КОТРАНСЛЯЦИОННЫЙ ФОЛДИНГ БЕЛКА ВНУТРИ РИБОСОМНОГО ТУННЕЛЯ ВЛИЯЕТ НА ВОВЛЕЧЕНИЕ ТРИГГЕР-ФАКТОРА

В последние годы, всё больший интерес у молекулярных биологов и биофизиков вызывает рибосомный туннель — канал, по которому синтезируемая на рибосоме полипептидная цепь выходит в цитоплазму. Последние исследования показали, что рибосомные туннели участвуют в образовании элементов вторичной структуры белка. Отдельные сегменты синтезируемой рибосомой полипептидной цепи в отдельных зонах рибосомного туннеля принимают компактную конформацию и сохраняют при перемещении по туннелю. Образование третичной структуры белка происходит на выходе полипептидной цепочки из рибосомного туннеля. В укладке третичной структуры (фолдинге) ключевую роль играют специальные белки шапероны. Они также участвуют в таких процессах как внутриклеточная сортировка белков и предотвращение агрегации. В *Escherichia coli* первым шапероном, который взаимодействует с полипептидной цепочкой на выходе из рибосомного канала, является триггер-фактор (англ. *trigger factor*, *TF*). Показано, что связывание триггер-фактора с синтезируемой на рибосоме полипептидной цепью определяется длиной и последовательностью аминокислот в полипептидной цепи. При этом, неясно, как влияет свёртка полипептидной цепи внутри рибосомного канала на участие триггер-фактора с полипептидной цепью.

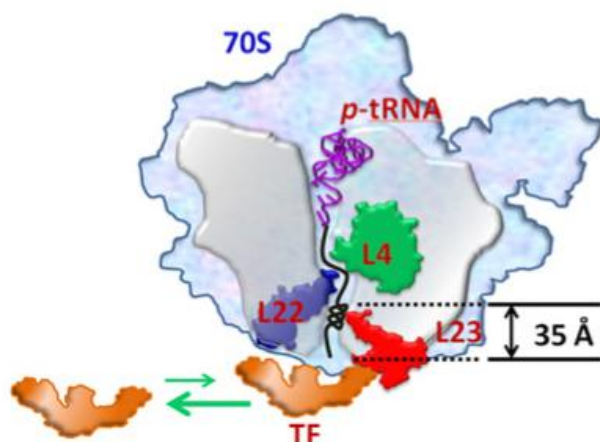


Рис. 1. Модель взаимодействия нарождающейся полипептидной цепи с нижней частью рибосомного туннеля.

Этот вопрос заинтересовал учёных из Национального университета Тайваня и Академии Синика. Ими был проведён конформационный анализ полипептидной цепочки внутри рибосомного туннеля методом фёрстеровского резонансного переноса энергии (англ. *FRET*). Для этого, методом направленного мутагенеза ими были введены специальные полиаланиновые вставки в растущую полипептидную цепь. По краям вставки с помощью содержащих флуоресцентную метку тРНК были пришиты два флуорофора, один из которых — донор, а второй — акцептор флуоресценции.

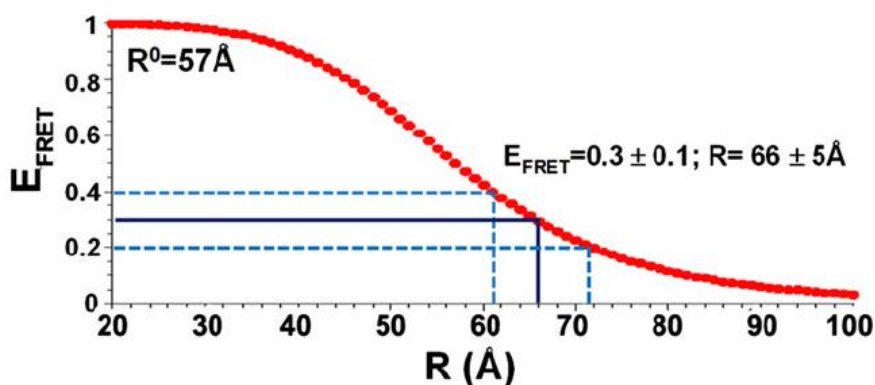


Рис. 2. Вычисление расстояния между флуорофорами по найденным значениям энергии FRET.

Время-разрешённые измерения флуоресценции проводились на **спектрофлуориметре ChronosFD (ISS, США)**. Отличием данного прибора является функция цифровой обработки сигналов в частотной области. Источником света являются лазерный диод и светодиоды, которые работают с установленной пользователем модуляцией частоты сигнала. Сигнал флуоресценции содержит основную частоту, повторяющую скорость работы лазера, и гармонические сигналы, отстающие по фазе. Встроенное программное обеспечение Vinci проводит математическую обработку сигнала, определяя амплитуду и отставание по фазе для каждого компонента. Для каждого исследуемого образца измерение проводится по несколько раз. По усреднённой разности фаз между флуоресценцией и возбуждением на заданной частоте и по отношению амплитуд происходит вычисление времени жизни флуоресценции. Данная технология позволяет с высокой точностью определять время затухания флуоресценции в диапазоне 10^{-12} — 1 с в широкой области длин волн. Кроме того, на основе полученных значений времени жизни флуоресценции Vinci определяет вклад каждого флуорофора в общую флуоресценцию и эффективность FRET.

На основании данных флуоресцентного анализа исследователями были выдвинуты предположения о конформации полипептидной цепочки внутри рибосомы и влиянии её структуры на функционирование триггер-фактора.

Подготовил Алексей Шнитко
 ООО «НКЦ «ЛАБТЕСТ»
 тел.: +7 495 605 35 07
 факс: +7 495 605 39 44
 a.shnitko@lab-test.ru
 www.lab-test.ru