



ООО «НКЦ «ЛАБТЕСТ»
Россия, Москва, 123557,
Большой Тишинский пер.38
Тел: +7 (495) 605 3507, 605 3610
Факс: +7 (495) 518 9452
info@lab-test.ru, www.lab-test.ru



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

Аннотация статьи:

Production of ribosome-released nascent proteins with optimal physical properties
David R. Ziehr, Jamie P. Ellis, Peter H. Culviner, Silvia Cavagnero.
Anal. Chem., 2010, 82, 4637–4643

ПОЛУЧЕНИЕ ОТДЕЛИВШИХСЯ ОТ РИБОСОМЫ НАСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ С ОПТИМАЛЬНЫМИ ФОТОФИЗИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

Комплексы рибосомных белков (RNCs) в бесклеточных системах и других биологически релевантных средах являются удобными моделями для исследования динамики и фолдинга насцентных полипептидных цепей и роли шаперонов в свёртывании полипептидной цепи белка в нативную конформацию в физиологических условиях. Растущий интерес учёных к этим процессам увеличил потребность в дополнительных исследованиях, цель которых — сравнение связанных с рибосомой и уже отделившихся белков. Для проведения подобных исследований нужны соединения, позволяющие отделить образующийся белок от рибосомы до завершения его синтеза. Обычно для этих целей используются три соединения — пурамицин, рибонуклеаза А и гидроксид натрия. Пурамицин является хорошо исследованным ингибитором трансляции. По химической структуре пурамицин подобен 3'-концу несущей тирозин тРНК, он взаимодействует со сложноэфирной связью в пептидил-тРНК с образованием пептидил-пурамицина, останавливая полипептидную цепь и отрывая белок от рибосомы. Однако последние исследования показали, что пурамицин может приводить к агрегации белка, поэтому его применение в научных исследованиях имеет ограничения. Рибонуклеаза А участвует в гидролизе фосфодиэфирных связей в РНК, разрушая таким образом рибосомы и способствуя освобождению белков. Но при этом полученные насцентные белки остаются связанными с 3'-аденозином в С-концевой области. Гидроксид натрия способствует отделению белков от рибосом без изменения структуры С-концевых областей, но в таких количествах, при которых рН среды значительно больше физиологически допустимых.

Группой американских исследователей из Висконсинского университета в Мадисоне было проведено исследование свойств насцентных белков, выделенных из рибосомных комплексов с помощью гидроксилamina и сравнение их свойств с вышеописанными тремя реагентами. В качестве модельного белка учёными был выбран флавогемоглобин (ароHmpH). Для синтеза белка исследователи использовали рибосомы *E. coli*, несущие плазмиды целевого белка. К насцентной полипептидной цепи ароHmpH исследователи прикрепляли флуоресцентную метку — сукцинимидиловый эфир 4,4-дифтор-5,7-диметил-4-бора-3а,4а-диаза-8-индацен-3-пропионовой кислоты.

Для наблюдения за деполяризацией флуоресценции исследователи использовали спектрофлуориметр 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. Математическая обработка полученного сигнала позволяет определить амплитуду и отставание по фазе для каждого компонента. По разности фаз между флуоресценцией и возбуждением на заданной частоте и по отношению амплитуд происходит вычисление времени жизни флуоресценции. Наличие в приборе поляризаторов возбуждающего и флуоресцентного излучения позволяет проводить измерения интенсивности флуоресцентного света, поляризованного в параллельной и перпендикулярной плоскостях, и определение поляризации флуоресценции. На основе полученных данных о затухании анизотропии флуоресценции производится вычисление корреляционного времени вращения макромолекулы. Корреляционное время вращения соответствует размерам белка.

Показано, что в отличие от пурамицина или рибонуклеазы А гидроксилламин вносит незначительные изменения в структуру насцентной цепи, проявляя активность в области физиологических значений pH в противоположность гидроксиду натрия. Исследователи уверены в том, что применение гидроксилламина для отделения белков от рибосом является многообещающим методом в исследованиях посттрансляционного фолдинга белков.

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