

5. Dower W. J., Miller J. F., Ragsdale C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation // Nucl. Acids Res.—1988.—16, N 13.—P. 6127—6145.
6. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолун А. Н. Определение минимального сегмента рибосомного белка *L10 E. coli*, сохраняющего регуляторную функцию // Докл. АН СССР.—1989.—309, № 2.—С. 493—496.
7. Sor F., Nomura M. Cloning and DNA sequence determination of the *L11* ribosomal protein operon of *Serratia marcescens* and *Proteus vulgaris*: Translation feedback regulation of the *Escherichia coli L11* operon by heterologous *L1* proteins // Mol. and Gen. Genet.—1987.—210, N 1.—P. 52—59.
8. Linn T., Pierre R. S. Improved vector system for construction transcriptional fusions that ensures independent translation of *lacZ* // J. Bacteriol.—1990.—172, N 2.—P. 1077—1084.

Ин-т клітин. біології і генет. інженерії АН України,
Київ

Одержано 04.11.91.

УДК 577.217.5;577.18.02

Н. І. Шульга, А. П. Потапов

ВПЛИВ НЕОМІЦИНУ НА ТРАНСЛЯЦІЮ ПОЛІ (U) І ПОЛІ (dT) У БЕЗКЛІТИННИХ БІЛОКСИНТЕЗУЮЧИХ СИСТЕМАХ З *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ТА *NEUROSPORA CRASSA*

Вивчено вплив різних концентрацій іонів магнію і аміноглікозидного антибіотика неоміцину на трансляцію полі(U) і полі(dT) у безклітинних білоксинтезуючих системах з *S. cerevisiae* та *N. crassa*. Показано, що трансляція полі(U) і полі(dT) здійснюється цитоплазматичними рибосомами. Підвищені концентрації іонів магнію стимулюють трансляцію полі(dT), неоміцин на відміну від прокариотичних систем пригнічує трансляцію обох матриць. Висловлено припущення про еволюцію структури декодуючого центру рибосоми у напрямі зростання вибірковості відносно структури сахаро-фосфатного кістяка матриці.

Вступ. Гіпотеза про стереоспецифічну стабілізацію кодон-антикодонних комплексів була запропонована для пояснення селекції аміноацил-тРНК на рибосомі [1, 2]. Вона постулює пряму взаємодію декодуючого центру рибосоми з сахаро-фосфатним кістяком кодон-антикодонних комплексів, завдяки чому рибосома «ощінює» стеричні параметри останніх. Висувається припущення, що зміна стереохімічних параметрів кодон-антикодонних дуплексів або декодуючого центру здатна суттєво впливати на точність процесу трансляції.

Природним полімером із зміненим сахаро-фосфатним кістяком є ДНК. Паралельне дослідження трансляції полі(U) і полі(dT) у безклітинних системах з прокариот показало, що підвищені концентрації іонів Mg^{2+} і антибіотик неоміцин пригнічують синтез поліфенілаланіну на матриці полі(U) і розблоковують трансляцію полі(dT) [3, 4]. Здатність систем зчитувати полінуклеотид може змінюватися за принципом «або рибо-, або дезоксирибоматриця». Ці дані свідчать про високу чутливість прокариотичних рибосом до структури сахаро-фосфатного кістяка матриці. Поряд з цим було виявлено, що рибосоми з вищих еукариот мають сувору вибірковість щодо структури сахаро-фосфатного кістяка матриці і не здатні змінювати її під впливом іонів магнію і неоміцину [5].

Метою цієї роботи було дослідження специфічності декодуючого центру рибосом з *S. cerevisiae* та *N. crassa* до структури сахаро-фосфатного кістяка синтетичних матриць полі(U) і полі(dT), а також вплив різних концентрацій неоміцину на зміну цієї специфічності.

Матеріали і методи. Використовували штами з Всесоюзної колекції мікроорганізмів: дріжджі *S. cerevisiae* ВКМУ-2549 і *N. crassa* ВКМФ-184 дикого типу. Отримання біомаси клітин дріжджів, їх руй-

нування та виділення постмітохондріального супернатанту за допомогою скляних бус провадили, як описано раніш [6]. Спори *N. crassa* пророщували у рідкому середовищі за Чапеком при активній аерації, біомасу збирали й розтирали зі скляним порошком, додаючи до 1 г біомаси 1 мл буферу. Буфер для гомогенізації біомаси дріжджів і нейроспори містив 20 мМ трис-НСІ, рН 7,5, 100 мМ ацетат калію, 2 мМ ацетат магнію, 2 мМ дитіотреїтол, 0,5 мМ фенілметилсульфонілфлюорид. Після центрифугування гомогенату при 30 000 *g* піпеткою Пастера відбирали 2/3 надосадової рідини та наносили на колонку з сефа-

Таблиця 1

Вплив хлорамфеніколу та циклогексаміду на трансляцію полі(U) і полі(dT) у безклітинній білоксинтезуючій системі з *S. cerevisiae*

Умови інкубації проб	Включення ¹⁴ С-фенілаланіну до продукту трансляції полі(U), імп/хв	Включення ³ Н-фенілаланіну* до продукту трансляції полі(dT), імп/хв
10 хв інкубації з матрицею без антибіотика	16 636	47 618
Те ж саме протягом 40 хв	56 496	201 545
30 хв інкубації з матрицею у присутності 1 мМ хлорамфеніколу	56 961	199 699
Те ж саме з 1 мМ циклогексамідом	15 928	48 101

Примітка. Антибіотики додавали до проб через 10 хв після початку інкубації. * Використовували суміш ³Н-фенілаланіну і ¹²С-фенілаланіну у пропорції 1 : 10, кінцева концентрація в пробі 40 мкМ.

дексом G-25, зрівноваженим тим самим буфером з додаванням 20 % гліцерину. В експериментах використовували реактиви виробництва «Calbiochem» (США), ¹⁴С-фенілаланін (13 ГБк/мМ) ЧСФР і полі(dT) — НДКТИ БАР (Бердськ, РФ). Трансляцію поліуклеотидів провадили у пробах об'ємом 50 мкл, які містили 30 мМ трис-НСІ, рН 7,5, 150 мМ ацетат калію, 16 (для системи з дріжджів) або 8 мМ ацетат магнію (для системи з нейроспори), 2 мМ дитіотреїтол, 2 мМ АТФ, 0,8 мМ ГТФ, 20 мМ креатинфосфат, 1,5 мкг креатинфосфокінази, 40 мкМ ¹⁴С-фенілаланін, 25 мкг полі(U) або 2,5 мкг полі(dT), 1,0 од. А₂₆₀ S₃₀-фракцій з *N. crassa* та *S. cerevisiae*. При вивченні впливу інгібіторів трансляції до проб після 10 хв інкубації вносили 1 мМ хлорамфенікол або 1 мМ циклогексамід, а потім інкубували ще 30 хв. В інших випадках інкубацію провадили на протязі 30 хв при 25 °С. Кількість синтезованого поліфенілаланіну визначали за радіоактивністю ТХУ-нерозчинного осаду, яку виміряли на лічильнику SL40 («Intertechnique», Франція) у системі толуол — РРО — РОРОР з ефективністю 50 %.

Результати і обговорення. У табл. 1 наведено дані про вплив хлорамфеніколу і циклогексаміду на трансляцію полі(U) і полі(dT) у безклітинній системі з дріжджів *S. cerevisiae*. Відсутність будь-якого ефекту з боку хлорамфеніколу підтверджує те, що препарати безклітинних білоксинтезуючих систем не містять домішок мітохондріальних рибосом, а цілковите пригнічення включення фенілаланіну до продукту трансляції полі(U) і полі(dT) 1 мМ циклогексамідом свідчить про трансляцію обох матриць цитоплазматичними рибосомами. Ми виявили також, що оптимальними концентраціями іонів магнію для трансляції полі(U) і полі(dT) у безклітинній системі з дріжджів і нейроспори є 16 та 8 мМ відповідно. Результати впливу різних концентрацій неоміцину на трансляцію обох матриць у безклітинних білоксинтезуючих системах наведено у табл. 2. Виявилось, що неоміцин пригнічує трансляцію обох матриць, причому за умов використання полі(dT) більше, ніж за трансляції полі(U). Порівняння цих результатів з даними, які були отримані раніш для безклітинних білоксинтезую-

чих систем з прокариот та вищих еукаріот [3—5], дозволяє зробити припущення про те, що декодуєний центр рибосоми протягом еволюції змінився у напрямі, по-перше, втрати специфічності у взаємодії з неоміцином і, по-друге, надбання суворої вибірковості у відношенні до

Таблиця 2

Вплив різних концентрацій неоміцину на ефективність трансляції полі(U) і полі(dT) у безклітинних білоксинтезуючих системах з *S. cerevisiae* та *N. crassa*

Умови проведення трансляції	<i>S. cerevisiae</i>		<i>N. crassa</i>	
	Включення ¹⁴ C-фенілаланіну до продукту трансляції, імп/хв		Включення ³ H-фенілаланіну до продукту трансляції, імп/хв	
	полі (U)	полі (dT)	полі (U)	полі (dT)
Трансляція у відсутності антибіотика	240 021	12 431	1 355 566	36 762
Трансляція у присутності неоміцину (мМ):				
25	99 723	3 326	1 053 141	12 876
50	62 321	922	691 793	3 014
100	11 485	0	124 708	764

структури сахаро-фосфатного кістяка матриці. У цьому випадку рибосоми з грибів займають проміжне положення між прокариотами та вищими еукаріотами, тобто здатні транслювати полі(dT) під впливом іонів магнію, але не здатні до переключення синтезу з рибона дезоксирибосоматрицю при дії неоміцину.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Potapov A. P. A stereospecific mechanism for the aminoacyl selection at the ribosome // FEBS Lett.—1982.—146, N 1.—P. 5—8.
2. Потопов А. П. Механизм стероспецифической стабилизации кодон-антикодоновых комплексов на рибосомах в ходе трансляции // Журн. общ. биологии.—1985.—46, № 1.—С. 63—67.
3. Role of a template sugar-phosphate backbone in the ribosomal decoding mechanism. Comparative study of poly(U) and poly(dT) template activity / A. P. Potapov, K. A. Soldatkin, A. P. Soldatkin, A. V. El'skaya // J. Mol. Biol.—1988.—203, N 4.—P. 885—893.
4. Гройсман И. С., Потопов А. П. Влияние мутаций белка S12 рибосом *Escherichia coli* на эффективность трансляции дезоксирибонуклеотидной матрицы поли(dT) // Биополимеры и клетка.—1989.—5, № 6.—С. 101—104.
5. Сравнительное изучение матричной активности поли(U) и поли(dT) в бесклеточных белоксинтезирующих системах из *Escherichia coli* и зародышей пшеницы / А. П. Потопов, К. А. Солдаткин, А. П. Солдаткин, А. В. Ельская // Биополимеры и клетка.—1988.—4, № 3.—С. 133—138.
6. Tuite M. F., Plesset J. mRNA-dependent yeast cell-free translation systems: theory and practice // Yeast.—1986.—2, N 1.—P. 35—52.

Ин-т молекуляр. біології і генетики АН України, Київ

Одержано 30.01.92