



УДК 577.217

© 1994 В. А. Ефимов, С. В. Ревердатто,
В. А. Бейлинсон, А. Ф. Фрадков, О. Г. Чахмахчева

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО D1-БЕЛОК ФОТОСИСТЕМЫ II ЯЧМЕНЯ, В *ESCHERICHIA COLI*

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Ключевые слова: фотосистема II, *psbA*-ген, гербицидсвязывающий белок, экспрессия в *E. coli*.

Сконструирован ряд плазмидных векторов для клонирования и экспрессии в *E. coli* «трудноклонлируемых» гетерологичных фрагментов ДНК. Осуществлена экспрессия гена *psbA*, кодирующего белок D1 реакционного центра фотосистемы II ячменя, под контролем T7-промотора в лизогенном штамме *E. coli*, содержащем в бактериальной хромосоме ген T7-полимеразы.

Белок D1 из тилакоидной мембраны растений, один из продуктов белкового синтеза в хлоропластах, участвует в процессе фотосинтеза, входя в состав реакционного центра (РЦ) фотосистемы (ФС) II — сложного мембранного пигментно-белкового комплекса, который представлен во всех фотосинтезирующих организмах. При этом белок D1 является ключевым элементом РЦ ФС II, где он вовлечен в процесс переноса электронов. Кроме того, этот белок способен связывать некоторые гербициды, в частности атразин и диурон [1, 2]. Структурно-функциональные исследования D1-белка злаковых растений представляют интерес для понимания процесса фотосинтеза и для конструирования устойчивых к гербицидам растений, в частности злаков. Одно из перспективных направлений в подобных исследованиях — использование методов генной и белковой инженерии для получения рекомбинантного D1-белка и его мутантов.

Ранее нами было осуществлено клонирование и определение первичной структуры гена *psbA*, кодирующего D1-белок ячменя, а также получен ряд мутантных форм этого гена [3, 4]. Следующей задачей стало создание штамма *E. coli*, способного продуцировать этот белок, чему и посвящено настоящее сообщение.

Известно, что эффективность экспрессии генов в бактериальных клетках зависит от целого ряда факторов, влияющих как на скорость синтеза соответствующих мРНК и белка, так и на их устойчивость в процессе синтеза и накопления в клетке. В первую очередь это факторы, обуславливающие эффективность процессов инициации транскрипции и трансляции, такие, как тип и сила промотора, строение участка связывания рибосом, вторичная структура мРНК в районе последовательности Шайна — Дальгарно и иницирующего кодона. Значительное влияние на выход рекомбинантного белка оказывают также

его физико-химические свойства, степень токсичности по отношению к клетке-хозяину, устойчивость к внутриклеточному протеолизу и т. д. Поэтому, несмотря на большое количество известных данных по экспрессии чужеродных генов в клетках бактерий, практически невозможно заранее предсказать, какой из перечисленных выше факторов может оказать решающее влияние на процесс биосинтеза рекомбинантного белка в каждом конкретном случае.

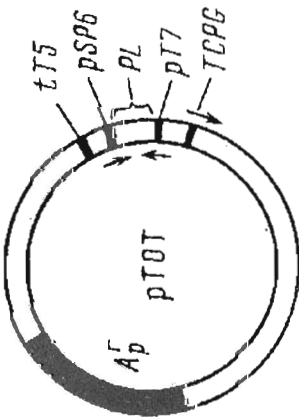
Решение подобной задачи в отношении *psbA*-гена усложняется неустойчивостью бактериальных штаммов, несущих этот ген в составе плазмидной или фаговой ДНК. Аналогичные трудности при попытке клонировать ген гербицидсвязывающего белка D1 отмечались и ранее [3]. Причина такого явления, по-видимому, состоит в токсичности рекомбинантного D1-белка. Поэтому первым этапом нашей работы стало конструирование ряда векторов для клонирования и экспрессии в *E. coli* «трудноклонлируемых» гетерологичных фрагментов ДНК.

При конструировании векторов для экспрессии гена *psbA* за основу была взята плазида pGEM-1 (Promega, США), полилинкерный участок которой фланкирован T7- и SP6-промоторами (*pT7* и *pSP6* соответственно) в противоположной ориентации. Эта плазида была сконструирована для проведения *in vitro* транскрипции. Введение этого вектора, содержащего клонированный в полилинкерном районе ген, в специальные штаммы *E. coli*, несущие клонированный в хромосоме ген T7-РНК-полимеразы под контролем промотора *lacUV5*, позволяет осуществлять экспрессию этого гена также *in vivo* [5].

Для предотвращения возможности протекания нежелательной транскрипции, инициирующейся с промотороподобных последовательностей плазмиды pGEM-1, расположенных левее и правее полилинкера, район полилинкера с прилегающими к нему T7- и SP6-промоторами, был фланкирован с обеих сторон участками терминации транскрипции. В качестве таковых были взяты терминатор гена кристаллического белка *Bacillus thuringiensis* (TSPG) и терминатор из области ранних генов D10—D15 бактериофага T5 (*tT5*) [6]. Выбор этих последовательностей был связан с тем, что они являлись одними из наиболее сильных известных терминаторов и были ранее успешно использованы нами для конструирования других векторов [7]. Терминатор TSPG содержит «шпильку» из 17 п. о., а терминатор фага T5 — «шпильку» из 13 п. о. Кроме того, их терминирующая функция не зависит от ориентации относительно гена (схема 1).

Синтетический фрагмент ДНК, соответствующий последовательности терминатора транскрипции фага T5, получали репаративной достройкой частичного дуплекса, образованного 3'-концами 35- и 36-звенных олигонуклеотидов, в полнотью двухцепочечный фрагмент ДНК с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* (фрагмент Кленова). Полученный дуплекс длиной 60 п. о. фосфорилировали и клонировали в предварительно линеаризованном по *NaeI*-сайту векторе pGEM-1 (с достроенными до «тупых» и дефосфорилированными 5'-концами). После трансформации штамма *E. coli* MN1 колонии, несущие в составе плазмиды терминатор T5, отбирали гибридизацией на нитроцеллюлозных фильтрах с 35-звенным ³²P-меченым олигонуклеотидом, входящим в состав клонируемого фрагмента. Ориентацию вставки и первичную структуру терминатора фага T5 в полученной таким образом плазмиде pGEM подтверждали секвенированием по методу Сенгера [8].

Последовательность синтетического фрагмента ДНК, соответствующую терминатору TSPG, содержащую 108 п. о., вырезали из ранее полученной в лаборатории плазмиды pPV6 [7] обработкой эндонуклеазами *PvuII* и *HindIII*. Выступающий 5'-конец этого фрагмента достраивали до «тупого» с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* (фрагмент Кленова) и клонировали в плазмиде pGEM по *PvuII*-сайту. После трансформации клеток *E. coli* DH5α отбор колоний проводили гибридизацией на нитроцеллюлозных фильтрах с ³²P-меченым дезоксирибонуклеотидом TCGACATTACAAATAGATAAATAATTTGTT. Структуру и ориентацию этого фрагмента после клонирования также подтверждали секвениров-



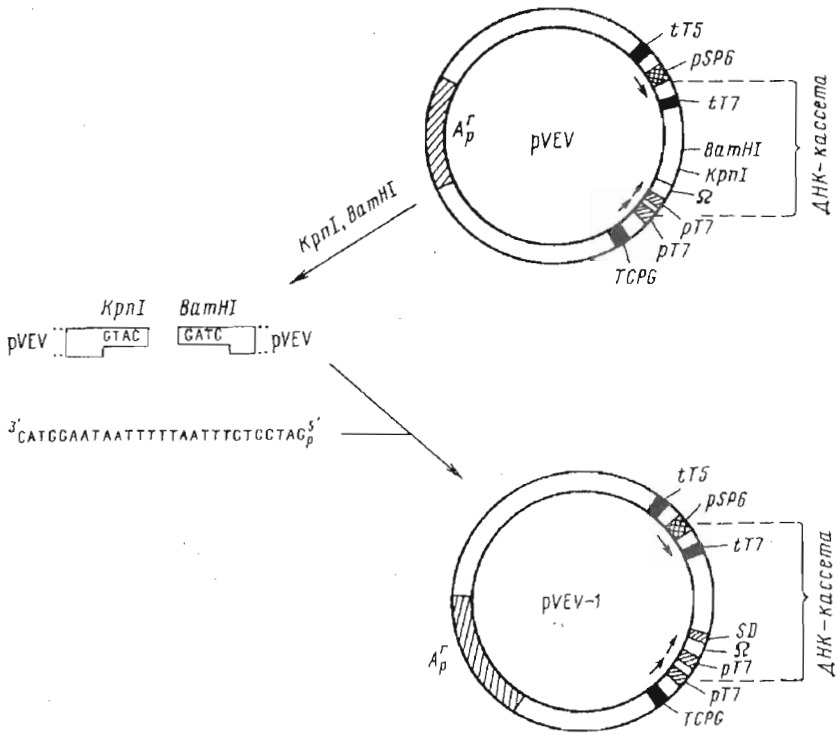
PACCTTCGGACATTACAAATAGAAAGTAATTTGTTGTAATGAAACGGACATCACCTCCATTTGAAACGGAGTGTCCGGTTTTACTATGTTATTTTCCTAGACAG
 TCGAACAGCTATAATGTTTATCTAATTCAATTAACAACATTACTTTTGGCTGTAGTGGAGGTAACCTTTGGCCCTACACAGGCAAAATGATACATAAAAGGATCTGTCTP

TCPG

PCCCTTAAATAAAGAAACCCSAGTGGATTTTGTCCSACTGGGGTTTTCTATTATTCCAGG
 TGGAAATTAATTTTTCTTTGGGGTCACTAAACAGGTGACSSCCSAAAGATAATAAGTCCCP

tT5

Строение плазмид pT0T и pTUT и структура терминаторов tT5 и TCPG. Стрелками показана ориентация терминаторов транскрипции и промоторов в плазмиде



Строение плазмид pVEV и pVEV-1. Нуклеотидная последовательность ДНК-касеты изображена на рис. 1

ванием. В результате были получены две плазмиды — pTUT и pTOT, различающиеся ориентацией терминатора TSPG (схема 1).

Для создания экспрессирующего вектора pVEV (схема 2) была взята плаزمида pTUT, полилинкерный участок которой заменялся на искусственный фрагмент ДНК длиной 402 п. о., содержащий последовательность промотора T7 РНК-полимеразы, модифицированную 5'-лидерную последовательность вируса табачной мозаики (TMV)- $\Omega\Delta_3$ [9], инициирующую область гена 10 фага T7 [10, 11], а также последовательности *kil*-пептида плазмиды ColE1 [12], терминатора РНК-полимеразы фага T7 [6] и ряда сайтов эндонуклеаз рестрикции (рис. 1).

В качестве энхансера трансляции мРНК была выбрана лидерная последовательность вируса табачной мозаики (TMV) штамма U1 (Ω), введение которой в 5'-конец матричной РНК, согласно литературным данным, приводило к значительному повышению эффективности трансляции *in vitro* и *in vivo* [13, 14]. Введение в полилинкерную кассету, наряду с регуляторными элементами инициации и терминации транскрипции и трансляции гена, последовательности *kil*-пептида из плазмиды ColE1 было сделано, чтобы обеспечить возможность секретиции целевого белка в периплазму *E. coli* или в межклеточное пространство, как было описано в работе [12]. 16 олигонуклеотидов, образующих этот фрагмент ДНК, фосфорилировали в присутствии [γ - 32 P]АТР и Т4-полинуклеотидкиназы, отжигали и сшивали с помощью Т4-ДНК-лигазы с образованием трех дуплексов с «липкими» концами. Последние выделяли электрофорезом в ПААГ и клонировали в плазмиде pTUT в два этапа. На первом этапе фрагмент I клонировали между *EcoRI*- и *BamHI*-сайтами плазмиды pTUT с получением вектора pTUT-ЕВ. На втором этапе фрагменты II и III одновременно клонировали в разрезанный по сайтам *BamHI* и *HindIII* вектор pTUT-ЕВ. После трансформации продуктов

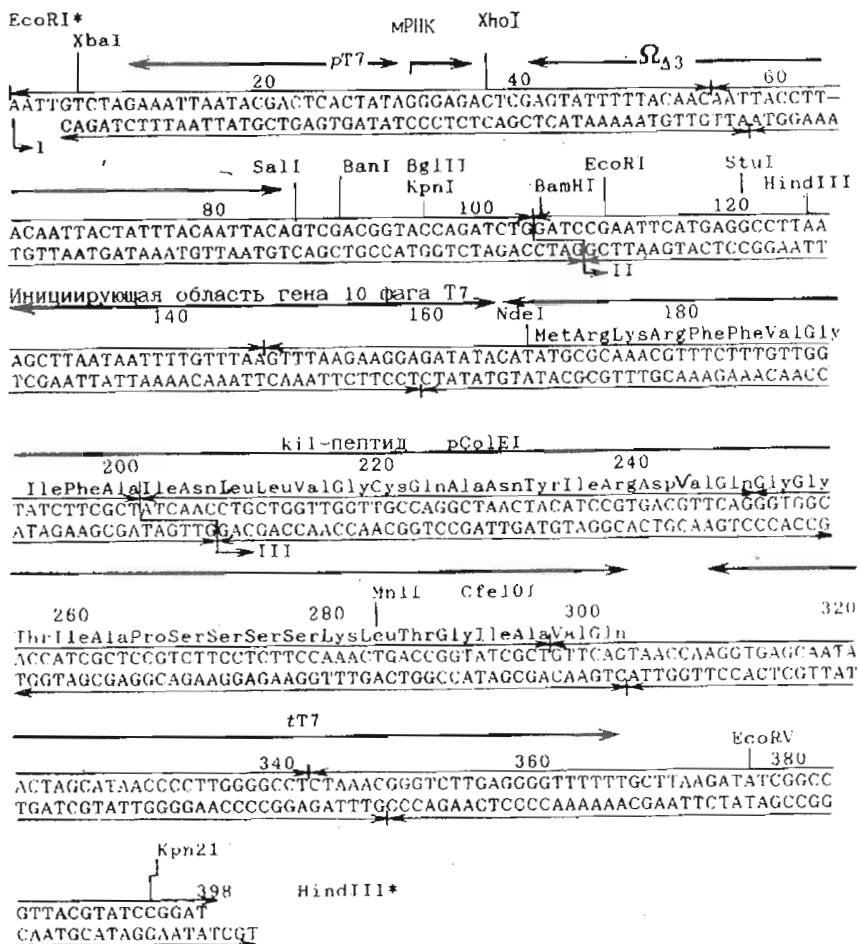
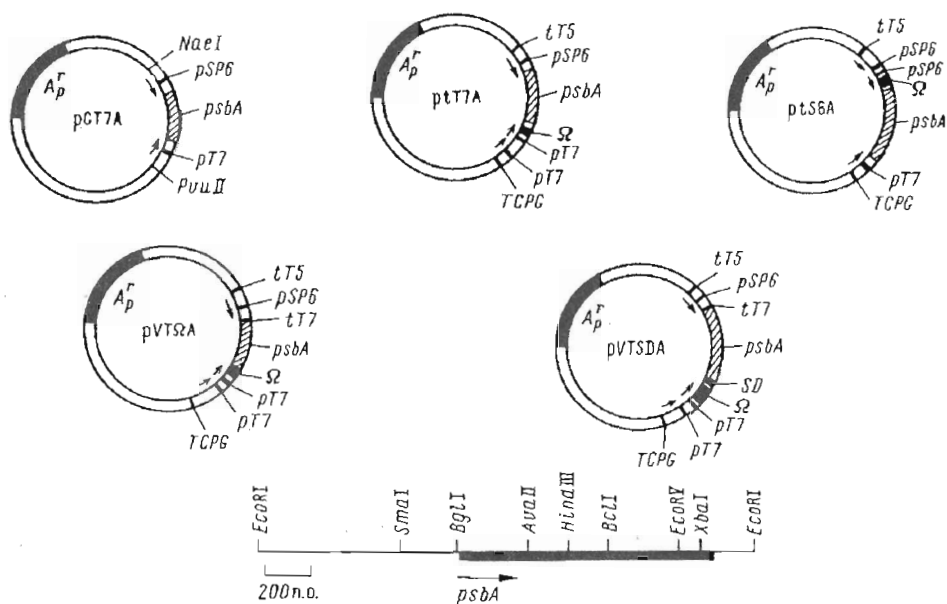


Рис. 1. Искусственный фрагмент ДНК, клонированный в плазмиде рTUT для получения плазмиды рVEV. Сайты *EcoRI** и *HindIII** обозначены условно, в конечном варианте они пропадают. Тонкими горизонтальными стрелками показаны использованные при конструировании синтетические олигонуклеотиды, утолщенными стрелками — функциональные элементы конструкции. Подстрочными цифрами I, II и III со стрелками показано начало дуплексов I, II и III

лигазной шивки в клетки *E. coli* DH5 α и отбора колоний гибридизацией с меченым олигонуклеотидом на нитроцеллюлозных фильтрах был найден клон, несущий искомую плазмиду рVEV (схема 2).

Как уже упоминалось, данный вектор содержит энхансер трансляции Ω_3 , который способен не только усиливать трансляцию чужеродных генов в клетках эукариот или в эукариотических белоксинтезирующих бесклеточных системах, но и достаточно эффективно инициировать трансляцию в прокариотических клетках, являясь, таким образом, функциональным аналогом последовательности Шайна-Дальгарно (SD) [10]. Однако эффективность экспрессии генов, не имеющих собственной SD, под контролем Ω в клетках в несколько раз ниже, чем в присутствии SD-последовательности [14]. Поэтому в вектор рVEV наряду с энхансером Ω_3 был введен участок, кодирующий SD-последовательность *E. coli*. С этой целью в плазмиде рVEV, разрезанной по *KpnI*- и *BamHI*-сайтам, клонировали 27-звенный олигонуклеотид

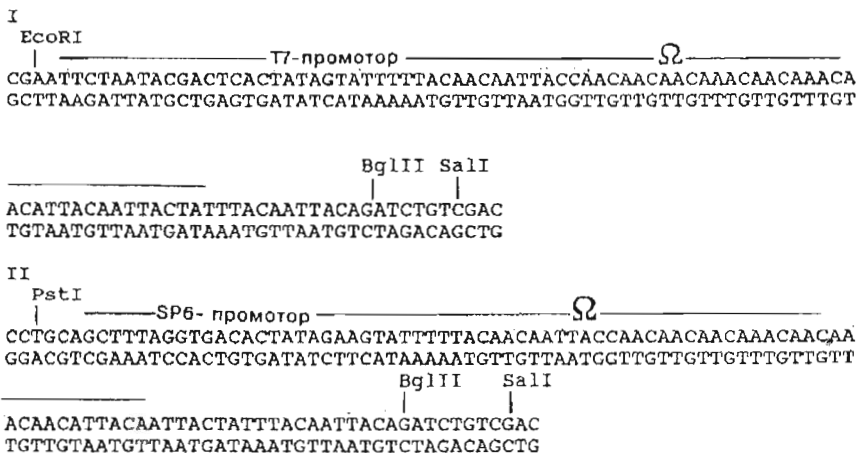


Строение экспрессирующих плазмид, содержащих ген *psbA*. Внизу показана рестриктная карта *EcoRI*—*EcoRI*-фрагмента хлоропластной ДНК ячменя, содержащего ген *psbA*

pGATCCTCTTTAATTTTAAATAAGGTAC, содержащий AT-богатую область и последовательность SD (схема 2). Клоны, несущие искомую плазмиду pVEV-1, отбирали гибридизацией с этим же олигонуклеотидом и строение синтетической вставки подтверждали секвенированием.

Для экспрессии ген *psbA* в *E. coli* было создано несколько экспрессирующих конструкций (схема 3). Ген *psbA* в виде *BglII*—*EcoRI*-фрагмента, у которого липкий *EcoRI*-конец предварительно дотраивали до тупого с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* (фрагмент Кленова) в присутствии четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, клонировали в pGEM-1 между *Bam*HI- и *Hinc*II-сайтами. В качестве сигнала инициации транскрипции был выбран промотор T7-РНК-полимеразы. Предполагалось, что роль последовательности Шайна — Дальгарно в данных конструкциях будет играть тетрапуклеотид GGGG, находящийся в области полилинкера и входящий в состав сайтов узнавания рестриктаз *Sma*I и *Bam*HI. Таким образом была получена плаزمида pGT7A, которой трансформировали клетки *E. coli* BL21(DE3), несущие в своей хромосоме клонированный ген T7-РНК-полимеразы под контролем *lacUV5*-промотора [5, 15].

Кроме того, ген *psbA* вводили в плазмиду pTUT (схема 1) в виде *EcoRI*—*EcoRI*-фрагмента хлоропластной ДНК ячменя размером около 2000 п. о. Таким образом, были получены две конструкции (pT7A и pS6A), различающиеся ориентацией гена относительно промоторов. Плазмиду pT7A подвергали частичному гидролизу эндонуклеазой рестрикции *EcoRI*, а затем обрабатывали эндонуклеазой *BglII*. Таким образом, была удалена 5'-концевая часть *EcoRI*—*EcoRI*-фрагмента хлоропластной ДНК, не содержащая последовательности гена *psbA*. Плазмиду pS6A с той же целью обрабатывали рестриктазами *Pst*I и *Bgl*II. В полученные таким образом векторы клонировали фрагменты ДНК, несущие T7- или SP6-промотор и лидерную последовательность вируса табачной мозаики штамма U1 (Ω):



Фрагменты ДНК, несущие последовательности промоторов и Ω, получали обработкой соответствующими эндонуклеазами рестрикции предварительно отожженных и достроенных с помощью ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) синтетических олигонуклеотидов. Наличие дополнительных T7- и SP6-промоторов предусматривало проведение экспрессии под контролем тандема промоторов. В результате были получены плазмиды pT7A и pS6A, в которых ген *psbA* находится под контролем соответственно T7- или SP6-РНК-полимеразных промоторов (схема 3).

Для введения гена *psbA* в плазмиду pVEV последнюю разрезали эндонуклеазами *Bgl*II и *Eco*RI. Полученный вектор лигировали с геном *psbA* (фрагмент *Bgl*II—*Eco*RI). Продуктом лигазной сшивки трансформировали клетки *E. coli* DH5α. Структуру полученной в результате селекции плазмиды pVTΩA в районе клонированного фрагмента ДНК подтверждали секвенированием по методу Сенгера.

Плазмиду pVEV-1 обрабатывали эндонуклеазами *Bam*HI и *Eco*RI и вводили в нее ген *psbA*, имеющий *Bgl*II- и *Eco*RI-концы, с образованием плазмиды pVTSDA (схема 3).

Для осуществления трансляции в эукариотической системе *in vitro* были синтезированы мРНК. Для этого плазмиды, несущие ген *psbA*, расщепляли эндонуклеазами рестрикции, сайты которых расположены непосредственно за терминирующим кодоном гена, что необходимо для эффективной транскрипции: в случае плазмид pT7A—*Bam*HI, pGT7A—*Eco*RI, pVTΩA—*Eco*RI, pVTSDA—*Eco*RI, pS6A—*Dra*I. Транскрипцию с полученных таким образом ДНК-матриц проводили с помощью РНК-полимераз T7 (в случае плазмид pT7A, pGT7A, pVTA, pVTSDA) либо SP6 (в случае плазмиды pS6A). Качество полученной мРНК проверяли электрофорезом в 1,5% агарозном геле. Трансляцию мРНК осуществляли в бесклеточной системе лизата ретикулоцитов кролика в присутствии ³⁵S-меченого метионина. Полученную при этом смесь разделяли электрофорезом в градиентном ПААГ и продукты идентифицировали радиоавтографией (рис. 2).

Как и следовало ожидать из литературных данных [16], в результате трансляции мРНК *psbA* на радиоавтографе были идентифицированы две белковые полосы размером ~33,5 и ~29 кДа, причем интенсивность первой была в 2—4 раза выше. Присутствие двух белковых продуктов можно объяснить наличием двух возможных сигналов инициации трансляции (*Met*¹ и *Met*³⁷) и образованием укороченного белка при начале трансляции с кодона *Met*³⁷. Эти результаты отличаются от ранее полученных данных по трансляции мРНК генов *psbA* гороха, табака, кукурузы в прокариотической системе *in vitro*, где выход белка с молекулярной массой 33,5 кДа был гораздо ниже выхода белка с массой 29 кДа [16, 17].

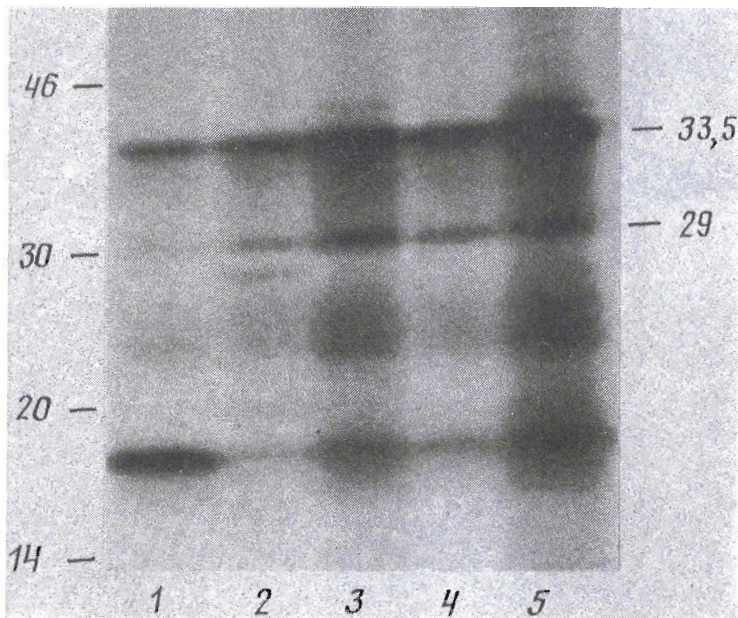


Рис. 2. Электрофорез в градиентном ПААГ (8—20%) продуктов трансляции *in vitro* мРНК гена *psbA*. Справа указаны положения целевых белков и их молекулярные массы. Приведены результаты трансляции мРНК, синтезированных *in vitro* с плазмид: рТ7А (1), рGT7А (2), рVTΩА (3), рVTSDA (4), рtS6A (5). Трансляция проводилась в бесклеточной системе лизата ретикулоцитов кролика в присутствии ^{35}S -Met. Цифры слева — стандарты молекулярных масс (кДа)

Для сравнения эффективности экспрессии гена *psbA* *in vivo* в составе векторов рТ7А, рVTΩА, рVTSDA, рGT7А штаммы, полученные введением этих плазмид в *E. coli* BL21(DE3), выращивали на минимальной среде. Лизаты отделенных центрифугированием клеток анализировали электрофорезом в 12% ПААГ с SDS. После прокрашивания белковых полос кумасси в случае штаммов, содержащих эти плазмиды, были выявлены слабые полосы, соответствующие белкам с молекулярной массой 33,5 и 29 кДа. Подобные полосы отсутствовали в суммарной картине белковых полос контрольного штамма BL21(DE3). Белки с молекулярной массой 33,5 и 29 кДа были идентифицированы нами как белковые продукты гена *psbA* методом иммуноблоттинга с использованием поликлональных кроличьих антител к белкам РЦ ФС II ячменя.

В результате подбора оптимальных условий ферментации выход рекомбинантного D1-белка был резко повышен и составил, по данным денситометрирования белковых зон на пластине с ПААГ, до 25—30% от суммарного количества белка в клетках *E. coli* в случае вектора рGT7А (рис. 3). Для ферментации была использована среда LB с добавлением 0,25% глюкозы и с последующей индукцией IPTG (изопропилтио-β-D-галактопиранозид). Добавление глюкозы ингибировало активность *lacUV5*-промотора, под контролем которого находится ген Т7-РНК-полимеразы в штамме BL21(DE3), что предотвращало синтез Т7-РНК-полимеразы и экспрессию токсичного для *E. coli* D1-белка в отсутствие индукции IPTG. При этом в штамме *E. coli* BL21(DE3)/рGT7А выход целевого белка с молекулярной массой 33,5 кДа был несколько выше (до 18%), чем белка с молекулярной массой 29 кДа (10—12%), а в штаммах *E. coli* BL21(DE3)/рVTSDA и BL21(DE3)/рVTΩА превалировала полоса с массой 29 кДа. Клетки, содержащие белковый продукт, разрушали ультразвуком, мембранную фракцию осаждали центрифугированием. Супернатант и осадок анализировали электрофорезом в

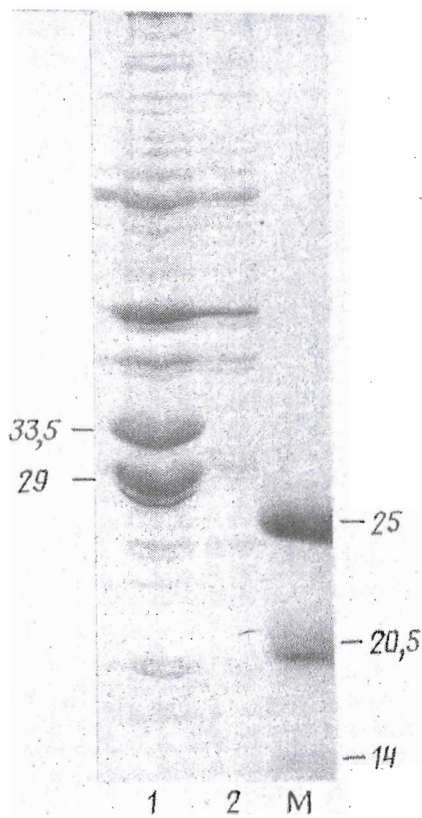


Рис. 3

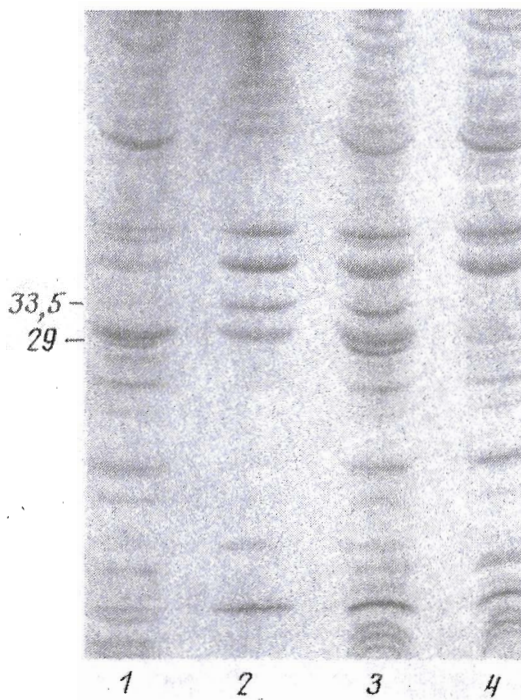


Рис. 4

Рис. 3. Электрофорез в 12% SDS-ПААГ продуктов *in vivo* экспрессии гена *psbA* в составе плазмиды pGT7A, в *E. coli* BL21 (DE3). 1 — индукция IPTG, 2 — без индукции. Слева показаны целевые продукты, M — стандарты молекулярных масс (кДа)

Рис. 4. Электрофорез в 12% ПААГ белков штамма BL21 (DE3)/pGT7A после индукции IPTG в течение 3 ч (1—3) и без индукции (4). Приведены белки растворимой фракции клеточного лизата (1), белки мембранной фракции клеточного лизата (2), суммарные клеточные белки (3)

ПААГ. Полоса, соответствующая белку с молекулярной массой 33,5 кДа, была обнаружена только в нерастворимой мембранной фракции, а белок с M 29 кДа — в обеих фракциях (рис. 4).

Таким образом, были сконструированы плазмиды, направляющие экспрессию D1-белка ФС II ячменя; показана принципиальная возможность экспрессии гена *psbA* в эукариотической системе *in vitro* и впервые получены штаммы *E. coli* — продуценты белка D1. В результате созданы предпосылки для получения в бактериях мутантных форм белка D1, устойчивых к действию гербицидов, и изучения их физико-химических свойств.

Экспериментальная часть

В работе использовались 2'-дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты (dNTP), бычий сывороточный альбумин (BSA), T4-ДНК-лигаза, T4-полинуклеотидкиназа, щелочная фосфатаза *E. coli* (Pharmacia, Швеция), акриламид, N,N'-метиленабис-акриламид, агароза, SDS (Bio-Rad, США), трис, дитиотреит, меркаптоэтанол,

изопропилтио- β -D-галактопиранозид (IPTG), EDTA, эндонуклеазы рестрикции, ДНК-полимераза I *E. coli* (фрагмент Кленова; Boehringer, ФРГ), ДНК-полимераза фага T7 («Ферментас», Литва), нитроцеллюлозные фильтры BA-85 (Schleicher und Schüll, ФРГ), бактоагар, триптон, дрожжевой экстракт (Difco, США), ампициллин (Sigma, США), [γ - 32 P]rATP уд. акт. 5000 Ки/ммоль, [α - 32 P]dNTP уд. акт. 3000 Ки/ммоль (Amersham, Англия).

Бактерии выращивали на LB-среде [18] с добавлением 100 мкг/мл ампициллина. Приготовление компетентных клеток *E. coli* и трансформацию бактериальных клеток осуществляли по описанной методике [19]. Плазмидную ДНК выделяли по методу [20]. Обработку ДНК эндонуклеазами рестрикции и реакцию лигирования проводили как описано в работе [21].

Химический синтез олигодезоксирибонуклеотидов осуществляли на синтезаторе фирмы Pharmacia фосфотриэфирным методом с использованием O-нуклеофильных катализаторов [22] или фосфитамидным методом [23].

Отбор колоний проводили методом гибридизации на нитроцеллюлозных фильтрах с 32 P-меченым олигонуклеотидом-зондом, входящим в состав соответствующей синтетической последовательности. Строение плазмидных ДНК, выделенных из колоний, давших положительные сигналы, подтверждали рестриктивным анализом и секвенированием по методу Сенгера [8].

Анализ продуктов экспрессии гена psbA in vivo. После трансформации описанных векторов, содержащих ген *psbA*, в экспрессирующий штамм BL21(DE3) отдельные колонии с чашки Петри переносили в жидкую питательную среду LB, содержащую 0,25% глюкозы и 100 мкг ампициллина в 1 мл. Клетки культивировали при интенсивном перемешивании при 37° С до достижения оптического поглощения 0,6—0,8 при 600 нм, после чего прибавляли раствор IPTG до конечной концентрации 0,5 мМ. После индукции клетки инкубировали еще 3—4 ч, затем собирали центрифугированием при 0° С (5—7 тыс. об/мин, 10 мин). Осажденные клетки ресуспендировали в 0,0625 М растворе трис-HCl (рН 6,8) из расчета 50 мкл раствора на 1,5 мл культуры клеток, к суспензии добавляли 100 мкл буфера Лэммли для нанесения (10% глицерин, 3% SDS, 5% меркаптоэтанол, 0,0625 М трис-HCl (рН 6,8), 0,002% бромфеноловый синий); перед нанесением на гель образец прогревали 3—5 мин в кипящей воде.

Электрофорез белков в 15% ПААГ проводили по методу [24] в пластинках (200×200×0,8 мм).

Электроблоттинг белков. После электрофореза белков в полиакриламидном геле часть геля отрезали и белковые зоны окрашивали кумасси, а остальной геле подвергали электроблоттингу. Электроперенос проводили 2 ч в специальной ячейке в буфере, содержащем 25 мМ трис, 192 мМ глицин, 20% метанол (этанол), 0,02% SDS, рН 8,3, при 10° С и напряжении 60 В. После переноса нитроцеллюлозу промывали от SDS в растворе PBS (8,006 г NaCl, 2,001 г KCl, 1,1 г Na₂HPO₄, 0,201 г KH₂PO₄ на 1 л H₂O, рН 7,2) 2 раза по 15 мин и выдерживали в течение ночи в 3% растворе BSA в PBS при 4° С. Затем проводили инкубацию в течение 2 ч при 20° С в PBS с 0,05% Tween-20 и 1% BSA с поликлональными кроличьими антителами к РЦ ФС II гороха. Далее инкубировали с конъюгатом пероксидазы с антителами против иммуноглобулинов кролика в 5 мл PBS с 0,05% Tween-20, 1% BSA в течение 2 ч при 20° С, фильтр тщательно отмывали буфером PBS с 0,05% Tween-20. После 20 мин обработки раствором субстрата, в качестве которого использовали 3,3'-диаминобензидин, нитроцеллюлозный фильтр промывали водой.

Иммуноферментный анализ проводили в основном как описано в работе [25] с использованием поликлональных кроличьих антител к РЦ ФС II и высокоспецифических антител к иммуноглобулинам кролика, конъюгированных с пероксидазой из хрена. В качестве субстрата брали о-фенилендиамин.

Авторы глубоко признательны М. С. Христину (Институт почвоведения и фотосинтеза, РАН) за предоставление антител к РЦ ФС II, Н. Н. Полушину, А. Л. Калинкиной и И. Н. Пашковой за синтез олигонуклеотидов, а также Ю. Л. Дорохову за помощь при проведении анализа экспрессии *in vitro*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rochaix J.-D., Erickson J.*//TIBS. 1988. V. 13. P. 55—59.
2. *Boyer S. K., Mullet J. E.*//Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 16. P. 8184.
3. *Ефимов В. А., Андреева А. В., Дмитракова Е. В., Пашкова И. Н., Ревердатто С. В., Юнг Р., Чахмахчева О. Г.*//Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 8. С. 1117—1121.
4. *Бейлинсон В. А., Ревердатто С. В., Ефимов В. А.*//Биоорган. химия. 1992. Т. 18. № 7. С. 920—923.
5. *Studier F. W., Moffatt B. A.*//J. Mol. Biol. 1986. V. 189. № 1. P. 113—130.
6. *Rosenberg A. H., Lade B. N., Chui D.-S., Lin S.-W., Dunn J. J., Studier F. W.*//Gene. 1987. V. 56. P. 125—135.
7. *Ефимов В. А., Мирских О. В., Бурякова А. А., Пашкова И. Н., Полушин Н. Н., Чахмахчева О. Г.*//Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 1. С. 90—102.
8. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.*//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 12. P. 5463—5467.
9. *Gallie D. R., Kado C. I.*//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 129—132.
10. *Olins P. O., Devine C. S., Rangwala S. H., Kavka K. S.*//Gene. 1988. V. 73. P. 227—235.
11. *Olins P. O., Rangwala S. H.*//J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 29. P. 16973—16976.
12. *Blanchin-Roland S., Masson J. M.*//Prot. Engineering. 1989. V. 2. № 6. P. 473—480.
13. *Gallie D. R., Slat D. E., Watts J. W., Turner P. C., Wilson T. M. A.*//Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 8. P. 3257—3273.
14. *Gallie D. R., Walbot V., Hershey J. W. B.*//Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 17. P. 8675—8694.
15. *Studier F. W., Rosenberg A. H., Dunn J. J., Dubendorff J. W.*//Meth. Enzymol. 1990. V. 185. P. 60—89.
16. *Cohen B. N., Coleman T. A., Schmitt J. J., Weissbach H.*//Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 15. P. 6221—6230.
17. *Eyal Y., Goloubinoff P., Edelman M.*//Plant Mol. Biol. 1987. V. 8. №4. P. 337—343.
18. *Миллер Д.* Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. С. 295.
19. *Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.* 1982. Molecular Cloning: a Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.).
20. *Birnboim H. C., Doly J.*//Nucl. Acids Res. 1979. V. 7. № 6. P. 1513—1523.
21. *Ефимов В. А., Бурякова А. А., Пашкова И. Н., Полушин Н. Н., Чахмахчева О. Г.*//Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 8. С. 1070—1077.
22. *Ефимов В. А., Бурякова А. А., Дубей И. Я., Полушин Н. Н., Чахмахчева О. Г., Охчинников Ю. А.*//Nucl. Acids Res. 1986. V. 19. № 16. P. 6525—6540.
23. *McBride L. J., Kirzek A., Beasage S. L., Caruthers M. J.*//J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 108. № 8. P. 2040—2048.
24. *Laemmli U. K.*//Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
25. *Фримель Х., Хольцгайт Г.*//Иммунологические методы/Ред. Фримель Г. М.: Медицина, 1987. P. 162—170.

Поступила в редакцию
5.IV.1993

После доработки
29.IX.1993

V. A. Efimov, S. V. Reverdatto, V. A. Beilinson,
A. F. Fradkov, O. G. Chakhmakhcheva

**EXPRESSION OF A GENE CODING FOR D1 PROTEIN OF BARLEY
PHOTOSYSTEM II IN *Escherichia coli***

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Previously characterized by us barley chloroplast *psbA* gene, which encodes one of the main Photosystem II components — D1 protein, has been inserted in a set of special plasmid vectors and its expression in vitro and in vivo has been investigated. Experiments on the in vitro expression in the rabbit reticulocyte lysate system revealed a major product with a molecular weight ca. 33.5 kD, which corresponds to the unprocessed D1 barley protein. A lower molecular weight protein (about 29 kD) was also observed. These results are in agreement with the existence of two potential translation start sites in the *psbA* gene in the same reading frame, the second one starting from Met³⁷ residue. The results fully correlate with the earlier data on the in vitro expression of *psbA* genes of maize, pea, and tobacco. Experiments on the in vivo expression of *psbA* gene in *E. coli* cells with the above constructions also revealed proteins with m. w. about 33.5 and 29 kD. The yield of the target recombinant protein in some cases was about 25—30% of the total *E. coli* cellular protein. The correspondence of the bands to the desired products was proved by the immunoenzyme analysis with the use of polyclonal antibodies. The data obtained show for the first time the construction of *E. coli* strains producing recombinant D1 protein of cereals in a high level.