

Оригинальная статья

УДК 577.29

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.297-311>**Бесклеточная система трансляции на основе клеточного экстракта эмбрионов *Gallus gallus*****А.Г. Бикмуллин¹, Э.А. Клочкова², Н.М. Александрова², К.С. Усачев^{1,2}✉**¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия²ФИЦ «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия✉ k.usachev@knc.ru**Аннотация**

Бесклеточные системы трансляции активно используются в практической и фундаментальной науке. Спектр их применения широк, но в основном они необходимы для препаративного биосинтеза белков, экспрессия которых в живых клетках сложна или невозможна, а также для быстрого анализа влияния внешних компонентов на процесс трансляции. Известны бесклеточные системы на основе клеток бактерий, дрожжей, растений, насекомых, млекопитающих и человека. Однако среди этого разнообразия нет представителей класса птиц, несмотря на их распространение как в дикой природе, так и вокруг человека (в быту, пищевой, легкой промышленности, сельском хозяйстве и др.). Система бесклеточной трансляции на основе экстракта клеток птиц востребована в качестве биотехнологического инструмента для решения проблем птицеводства, а также для фундаментальных исследований белоксинтезирующего аппарата птиц. Разработана бесклеточная система трансляции на основе экстракта клеток эмбрионов домашней курицы *Gallus gallus*. После предварительной пробоподготовки и поиска подходящей мРНК проведена реакция бесклеточного биосинтеза люцифферазы светлячка в химически дополненном клеточном экстракте.

Ключевые слова: бесклеточная система трансляции, *Gallus gallus*, биосинтез белка *in vitro*, IRES.

Благодарности. Авторы благодарны Евгении Андреевне Пановой, Илье Михайловичу Теренину и Сергею Евгеньевичу Дмитриеву (МГУ им. М. В. Ломоносова) за предоставленные мРНК и консультации при планировании и выполнении эксперимента, а также Александру Александровичу Голубеву за помощь и поддержку на всех этапах исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта № 075-15-2021-1344 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Для цитирования: Бикмуллин А.Г., Клочкова Э.А., Александрова Н.М., Усачев К.С. Бесклеточная система трансляции на основе клеточного экстракта эмбрионов *Gallus gallus* // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2025. Т. 167, кн. 2. С. 297–311. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.297-311>.

Original article

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.297-311>

Avian cell-free translation system based on the cell extract of *Gallus gallus* embryos

A.G. Bikmullin¹, E.A. Klochkova², N.M. Alexandrova², K.S. Usachev^{1,2}✉

¹Kazan Federal University, Kazan, Russia

²FRC Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia

✉k.usachev@knc.ru

Abstract

Cell-free translation systems are gaining increasingly widespread use, from both practical and fundamental standpoints. Their applications are diverse but typically revolve around preparative biosynthesis of proteins in cases where expression in living cells is either problematic or unfeasible. They also enable rapid evaluation of the effects produced by external components on the translation process. Existing cell-free systems have been derived from bacterial, yeast, plant, insect, mammalian, and human cells. However, no cell-free systems have been developed from avian cells, despite the ecological and economic significance of birds (in daily life, food production, light industry, agriculture, etc.). Such systems would be powerful biotechnological tools and bring considerable benefits for both poultry farming and fundamental research on the protein synthesis in birds. To address this gap, a cell-free translation system using the extracts from the cells of domestic chicken (*Gallus gallus*) embryos was developed. Following the sample preparation and mRNA selection, the cell-free biosynthesis of firefly luciferase was performed in a chemically supplemented cell extract.

Keywords: cell-free translation system, *Gallus gallus*, *in vitro* protein biosynthesis, IRES

Acknowledgments. mRNA samples and expert guidance on the experiment design and execution were kindly provided by Evgeniya A. Panova, Ilya M. Terenin, and Sergey E. Dmitriev (Moscow State University). Alexander A. Golubev is gratefully acknowledged for his assistance throughout the study.

This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project no. 075-15-2021-1344).

For citation: Bikmullin A.G., Klochkova E.A., Alexandrova N.M., Usachev K.S. Avian cell-free translation system based on the cell extract of *Gallus gallus* embryos. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2025, vol. 167, no. 2, pp. 297–311. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.297-311>. (In Russian)

Введение

Бесклеточные (*in vitro*) системы биосинтеза белка (трансляции) являются широко распространенным инструментом молекулярной биологии и биотехнологии для исследования механизма работы белоксинтезирующего аппарата клетки и препаративного получения рекомбинантных белков, особенно когда их наработка в живых клетках затруднена или невозможна. Эта методология активно используется в области синтетической биологии и метаболической инженерии для моделирования клеточных процессов в различных заданных условиях. Трансляция *in vitro* – это полностью открытая система с возможностью внешнего контроля (состав и условия) и прямого внедрения дополнительных компонентов, в частности, потенциальных ингибиторов биосинтеза белка, ДНК-, РНК-матриц и генетических регуляторных элементов, белков, факторов и т. д., для исследования их влияния на работу системы. С помощью бесклеточных систем трансляции (БСТ) возможно включение синтетических модифицированных аминокислот в состав белка [1, 2].

Существуют два типа БСТ: система трансляции и сопряженная система транскрипции-трансляции. В первом типе происходит синтез полипептидной цепи с матричной РНК (мРНК). Сопряженные системы сочетают в себе оба фундаментальных этапа: транскрипцию (синтез мРНК с матрицы ДНК с помощью РНК-полимеразы) и трансляцию. В качестве ДНК матрицы могут быть использованы как плазмидные векторы, так и линейные фрагменты полимеразной цепной реакции. Достоинством сопряженных систем является значительная экономия времени получения целевого белка, так как отсутствует трудоемкий этап подготовки мРНК [3, 4].

Основу БСТ составляют клеточные экстракты (лизаты) различной степени чистоты или смеси очищенных компонентов белоксинтезирующего аппарата клетки. Получение клеточных экстрактов является технологически более простым, быстрым и дешевым подходом. В отличие от способов непосредственного культивирования патогенов, БСТ на основе экстрактов клеток патогенных микроорганизмов не требуют специальных условий и уровня защиты лаборатории [5], что является их значимым преимуществом.

Клеточный лизат для получения белка *in vitro* был впервые использован в конце 1940-х годов. Для включения радиоактивно меченых аминокислот в состав синтезируемого белка и измерения скорости синтеза белка был применен лизат клеток печени крыс [6]. В течение следующих десятилетий были разработаны десятки БСТ на основе клеточных экстрактов различных организмов и их тканей. В настоящее время наиболее распространенными являются системы на основе клеточных лизатов грамотрицательных бактерий *E. coli*, проростков пшеницы, ретикулоцитов кроликов, яичников китайских хомячков СНО, пекарских дрожжей *S. cerevisiae*, насекомых *S. frugiperda*, человеческих клеток HeLa и др. [7–14]. Со времени разработки эти БСТ были оптимизированы и приобрели ряд усовершенствований, что позволило увеличить стабильность, эффективность и время работы системы. БСТ на основе разных клеточных экстрактов стали более универсальными, например, стала возможна трансляция крупных эукариотических (даже мембранных) белков в бактериальных системах [15, 16]. На сегодняшний день доступны коммерческие наборы различных *in vitro* систем трансляции, сформированы основные алгоритмы разработки систем биосинтеза белка *in vitro*, что позволяет создавать системы под конкретные узконаправленные цели.

Для быстрой качественной и количественной оценки работы БСТ (например, при ее оптимизации) используют матрицы, несущие гены белков, наличие которых в смеси можно легко детектировать. В основном это флуоресцентные белки, например, зеленый флуорес-

центный белок GFP [17]. Также часто используют люциферазы, которые в присутствии субстрата люциферина катализируют реакцию его окисления, сопровождающуюся испусканием света. Поскольку люминесценция не подвержена влиянию компонентов экстракта, этот метод отличается высокой чувствительностью [18].

Метод трансляции *in vitro* в целом и каждая его разновидность в частности имеют свои преимущества и недостатки. В определенных условиях БСТ могут производить белок в количестве, сопоставимом с уровнем экспрессии внутри клеток. В таких системах отсутствует необходимость длительного культивирования клеточных культур, и срок получения целевого белка сокращается с 1–2 дней до нескольких часов. Поскольку биосинтез происходит уже вне клеток, становится возможной наработка токсичных, мембранных, вирусных и сложно экспрессируемых белков. Открытость БСТ позволяет адаптировать условия процесса, например, ионную силу, pH, температуру, окислительно-восстановительный потенциал, концентрации мРНК и компонентов реакционной смеси. Для увеличения эффективности синтеза белка становится возможным внесение и определение оптимального количества дополнительных компонентов (аминокислоты, тРНК, полиамины, ферментативные системы регенерации энергии и др.). Добавление в систему ингибиторов эндогенных протеаз и РНКаз позволяет избежать быстрого расщепления белка-продукта и мРНК, соответственно [19, 20]. Малые объемы реакционных смесей снижают потребление реактивов, а также время анализа белкового продукта и скрининга различных условий реакции и генетических регуляторных элементов. Клеточные экстракты могут содержать ферментативные системы посттрансляционной модификации, что необходимо для получения белка, обладающего нативной активностью [20].

Недостатком БСТ часто является высокая стоимость по сравнению с классическими методами внутриклеточной экспрессии белков. Чем больше размер белка, тем меньше эффективность его наработки в *in vitro* системе. Предварительная подготовка исходных реагентов и оптимизация работы системы занимает длительное время. Некоторые компоненты системы требуют специальных условий хранения и быстро теряют активность. Длительная работа системы требует добавления внешних источников энергии, а продукты работы ферментативных реакций экстракта ингибируют трансляцию.

Сопряженные БСТ с ДНК-матрицей обычно являются бактериальными, тогда как в эукариотических системах вносят готовую мРНК. Для инициации трансляции молекула мРНК эукариот должна нести на 5'-конце специальный модифицированный гуанозиновый нуклеотид – так называемый кэп. Также в регуляции трансляции и защите мРНК от расщепления играют важную роль 5'- и 3'-нетранслируемые области (НТО), между которыми расположена последовательность, кодирующая белок. Матрицы некоторых внутриклеточных белков, а также вирусов имеют специальные последовательности внутренней посадки рибосомы (IRES) на 5'-НТО, обеспечивающие кэп-независимую трансляцию. Эти знания помогают ученым с помощью молекулярно-генетического инструментария синтезировать мРНК, подходящие для трансляции в эукариотах. Имеется библиотека различных последовательностей IRES и НТО, которые активно применяются в БСТ. При разработке эукариотических БСТ для эффективного биосинтеза белка необходимо проводить поиск оптимальных НТО. Низкая стабильность мРНК, постоянный риск ее расщепления и необходимость выделения в условиях без РНКаз делают БСТ с матрицей мРНК более сложными в использовании [21].

Подходящая БСТ выбирается в зависимости от целей и области исследования, характеристик белкового продукта и организма-хозяина. Для большинства эукариотических белков

необходимы посттрансляционные модификации, что делает невозможным их синтез в бактериальных системах. Для исследования белков человека выбирают БСТ на основе лизатов клеток млекопитающих, так как они наиболее точно имитируют клетки человека [22]. Система на основе лизата имеет преимущество перед системой очищенных компонентов, так как экстракт содержит в себе вспомогательные гены белков посттрансляционных модификаций и белки шапероны, что обеспечивает правильное сворачивание белка-продукта. Однако система на основе лизата имеет более сложный состав, то есть имеется потенциально большее число источников фона, затрудняющих анализ количества и характеристик целевого белка [23].

Несмотря на большое разнообразие БСТ на основе экстрактов различных клеток (от прокариотических клеток до клеток млекопитающих), остается востребованной разработка новых систем для решения конкретных фундаментальных и практических задач. Существуют широко распространенные и используемые человеком организмы, для которых БСТ не представлены. К их числу относятся представители класса птиц. БСТ на основе клеток птиц имеют большой потенциал и будут востребованы в качестве эффективного биотехнологического инструмента для решения проблем птицеводства, а также для фундаментальных исследований белоксинтезирующего аппарата птиц.

В настоящее время птица является самым потребляемым видом мяса и главным источником пищевого белка для человека. В 2020 году производство мяса птицы составило более 40 % от общего мирового производства [24]. Количество фермерских хозяйств различного масштаба растет вместе с населением планеты. Огромное количество антибиотиков различных классов используют в птицеводстве для метафилактики, профилактики и лечения инфекционных заболеваний (бактериальных и грибковых), а также в качестве стимуляторов роста [25]. Большая часть известных и применяемых в практике антибиотиков нацелена на остановку биосинтеза белка клетки, а именно на этапы транскрипции или трансляции. Однако влияние широко применяемых в птицеводстве антибиотиков непосредственно на биосинтез белка в птичьих клетках не исследовано. Система трансляции *in vitro* позволит определить, каким образом антибиотики против бактериальных и грибковых инфекций влияют на биосинтез белка в клетках птиц. Кроме того, представляет интерес сравнительный анализ действия различных антибиотиков на БСТ из других прокариотических и эукариотических организмов, что дает возможность оценки селективности антибиотиков. БСТ, в особенности сопряженная, является эффективным инструментом для быстрого скрининга потенциальных антибиотиков. БСТ на основе лизата клеток птиц в комплексе с БСТ бактерий, дрожжей и млекопитающих позволит подбирать селективные ингибиторы, наиболее безопасные для птиц.

Ключевым и центральным элементом системы трансляции является рибосома. Рибосомы эволюционно далеких друг от друга организмов имеют общую структурно-функциональную основу, но имеют определенные отличия. И если является очевидным существенное различие рибосом прокариот и эукариот, то между отдельными царствами эукариот рибосомы также варьируются. По мере эволюционного развития организмов строение рибосомы усложнялось. Недавние результаты, полученные с помощью метода криоэлектронной микроскопии, выявили структурные особенности рибосом домашних кур *Gallus gallus*, отличающие их от рибосом простейших эукариот (дрожжей) и млекопитающих [26]. Так, отличаются структуры фрагментов экспансии рРНК, функция которых неизвестна, но, вероятно, связана с работой транслирующей рибосомы. Это позволяют разработать хими-

чески активную молекулу, которая, подобно антибиотику, сможет избирательно связываться с определенным участком фрагмента экспансии рРНК и инактивировать рибосому конкретного организма. Эффективным методом скрининга таких потенциальных антибиотиков станет бесклеточная система биосинтеза белка.

В настоящей работе рассмотрена система трансляции *in vitro* на основе экстракта эмбрионов домашней курицы *Gallus gallus*. Оплодотворенные куриные яйца – это доступный для приобретения и недорогой источник необходимого биоматериала. Разработан протокол получения клеточного экстракта из эмбрионов куриц, подобраны состав реакционной смеси и условия реакции трансляции, произведен подбор подходящей мРНК и проведена реакция *in vitro* трансляции. Полученные результаты могут стать полезным инструментом для исследования белоксинтезирующего аппарата птиц, что имеет фундаментальное и практическое значение.

1. Экспериментальная часть

1.1. Планирование эксперимента. Выбор характеристик будущей БСТ на основе экстракта эмбрионов *Gallus gallus* базируется на данных научной литературы и опубликованного ранее патента [27], согласно которым наиболее распространенными и эффективными на сегодняшний день эукариотическими БСТ являются системы на основе клеточных экстрактов с мРНК в качестве матрицы [14, 28, 29]. Для обнаружения продукта биосинтеза и оценки уровня трансляции была выбрана люминесцентная люциферазная ферментативная система светлячка *Photinus pyralis*, в которой субстратом является люциферин [18]. Креатинфосфокиназная ферментативная система обеспечивает регенерацию энергии в реакционной смеси [14].

В качестве основы для разработки состава реакционной смеси рассмотрены БСТ на основе экстрактов дрожжевых клеток, клеток яичников китайских хомячков СНО, HeLa и золотистого стафилококка [9, 14, 30]. Для первоначального анализа использованы концентрации компонентов, оптимальные для описанных бесклеточных систем. Выбор подходящей матрицы был основан на скрининге нескольких вариантов мРНК, несущих ген люциферазы светлячка, отличающихся регуляторными НТО на 5'- и 3'-концах.

1.2. Получение клеточного экстракта. Для выделения экстракта из эмбрионов *Gallus gallus* использовали 5–10 оплодотворенных куриных яиц, инкубирование которых проводили в течение 5 сут в термостате при 38 °С и относительной влажности 70–80 %. Последующее извлечение эмбрионов из яиц осуществляли в стерильных условиях на льду [26] пинцетом через отверстие в скорлупе диаметром 2–3 см, после чего промывали на весу с помощью пипетки Пастера 1 мл холодного гипотонического буферного раствора (20 mM HEPES–KOH, pH 7.5; 10 mM CH₃COOK; 1.15 mM KCl; 1.8 mM Mg(CH₃COO)₂; 1 mM дитиотреитол; коктейль ингибиторов протеаз PIC (Thermo Fisher Scientific Inc., США) – 1 таблетка на 50 мл буферного раствора) и перемещали в пластиковую пробирку объемом 15 мл, содержащей 0.1–0.2 мл холодного гипотонического буферного раствора [14, 31]. Все дальнейшие манипуляции с эмбрионами и экстрактом производили при 4 °С или на льду. После инкубации на льду в течение 40 мин эмбрионы переносили в механический измельчитель тканей по типу гомогенизатора Поттера (Tissue grind comp, Kimble Chase, США). Разрушение проводили на льду, ~ 50 движений поршнем измельчителя обеспечивало получение гомогенного экстракта. Полученный лизат с помощью пипетки переносили в пластиковые пробирки объемом 2 мл и очищали от крупных клеточных обломков и жировой фракции центрифугированием на настольной центрифуге MiniSpin+ (Eppendorf, Германия) при 12000 g, 4 °С

в течение 5 мин. Среднюю фазу аккуратно отбирали, переносили в новую пробирку и повторяли центрифугирование в тех же условиях. Супернатант переносили в новую пробирку, измеряли объем и добавляли к нему 1/14 часть концентрированного буферного раствора (20 мМ HEPES-KOH, pH 7.5; 997.5 мМ CH_3COOK ; 1.15 мМ KCl; 1.8 мМ $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$; 1 мМ дитиотреитол). Для удаления эндогенных мРНК, которые являются источником фоновой трансляции, проводили обработку экстракта микрококковой нуклеазой S7 с последующей ее инактивацией этиленгликоль-бис-(аминоэтилэфир)- N,N,N',N' -тетрауксусной кислотой [9]. Исходную нуклеазу с концентрацией 7500 Ед/мл (Roche, Германия) добавляли к экстракту до конечной концентрации 10 Ед/мл. Реакцию запускали добавлением CaCl_2 до концентрации 1 мМ, смесь инкубировали в течение 2 мин при 25 °С. Для остановки реакции в смесь добавляли этиленгликоль-бис-(аминоэтилэфир)- N,N,N',N' -тетрауксусную кислоту до конечной концентрации 6.7 мМ.

После измерения оптической плотности экстракта при длине волны 260 нм (значение должно составлять ~ 70–100 отн.ед./мл) с помощью спектрофотометра Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific Inc., США) образец фракционировали по 110 мкл и замораживали в жидком азоте. Готовый экстракт хранили при –80 °С в течение нескольких месяцев.

1.3. Образцы мРНК для исследования. Образцы мРНК для проверки бесклеточной системы предоставлены Евгенией Андреевной Пановой, научным сотрудником Института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им М. В. Ломоносова.

В набор входили:

1) 5'-кэпированная бицистронная матрица с IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV) перед геном люциферазы светлячка и полиадениновой последовательностью на 3'-конце (EMCV-*fluc*-мРНК) [32];

2) 5'-кэпированная бицистронная матрица с IRES вируса пчел (BQCV) перед геном люциферазы светлячка и полиадениновой последовательностью на 3'-конце (BQCV-*fluc*-мРНК) [33];

3) 5'-кэпированная бицистронная матрица с IRES вируса классической чумы свиней (CSFV) перед геном люциферазы светлячка и полиадениновой последовательностью на 3'-конце (CSFV-*fluc*-мРНК);

4) 5'-кэпированная моноцистронная матрица с геном люциферазы светлячка, 5'- и 3'-НТО гена $\alpha 1$ -субъединицы гемоглобина человека и полиадениновой последовательностью на 3'-конце (HBA1-*fluc*-мРНК) [34];

5) 5'-кэпированная моноцистронная матрица с геном люциферазы светлячка, 5'НТО гена белка β -актина человека и 3'полиадениновой сигнальной последовательностью вируса SV40 (ACTB-*fluc*-мРНК) [32];

В бицистронных мРНК перед вирусными IRES находился ген *rluc* (люциферазы *Renilla reniformis*), экспрессия которого также происходила кэп-зависимо.

1.4. Приготовление реакционной смеси. Общий объем реакционной смеси для каждого варианта системы (контроль и опыт) составил 50 мкл (3 повторности по 15 мкл, 5 мкл запаса). Компоненты реакционной смеси, которые хранили при температуре –80 °С, разморозили на льду. Для осаждения агрегировавшей фракции оттаявший экстракт центрифугировали на настольной центрифуге MiniSpin+ (Eppendorf, Германия) при 14500 об/мин в течение 10 мин при 4 °С, супернатант переносили в новую пробирку. Смешивание компонентов проводили на льду [30]. Для приготовления реакционной смеси компоненты

вносили в фильтрованную деионизированную воду MQ в следующем порядке (в скобках указана концентрация компонента в смеси): HEPES-КОН pH 7.5 (20 мМ), дитиотреитол (4.5 мМ), ацетат магния (0.6 мМ), ацетат калия (100 мМ), смесь 20 аминокислот (по 0.1 мМ каждой), дрожжевая тРНК (0.25 мг/мл), аденозинтрифосфат (1.26 мМ), гуанозинтрифосфат (0.12 мМ), креатин фосфат в виде динатриевой соли (20 мМ) от Sigma-Aldrich (США), ингибитор РНКаз (1 Ед/мкл) от Биоллабмикс (Россия), креатинфосфокиназа (0.1 мг/мл) от Sigma-Aldrich (США), люциферин (0.1 мМ) от Merck (США), клеточный экстракт (50 % от объема смеси) [9, 14]. Затем реакционную смесь разделяли на две пробирки: опытную, в которую вносили мРНК (до финальной концентрации в смеси: 20 нг/мкл), и контрольную с водой MQ вместо матрицы. Общий объем раствора в каждой пробирке составлял 50 мкл. Для одновременного запуска реакции можно использовать многоканальную пипетку.

1.5. Постановка реакции. Реакцию трансляции *in vitro* проводили в 384-луночном планшете из черного непрозрачного пластика (Greiner Bio-One, Австрия) в фотометре Feyond-A300 (Allsheng, КНР) при температуре 30 °С. В лунку вносили 15 мкл реакционной смеси. Кинетику реакции испускания света измеряли в течение 1 ч с периодичностью 2 мин.

1.6. Статистическая обработка данных. Все измерения проводили в трех повторностях. Результаты представляли как среднее значение и стандартное отклонение, которые рассчитывали с помощью программного пакета Excel (Microsoft Corp., США).

2. Результаты и их обсуждение

Предварительные исследования показали, что пятидневные эмбрионы являются оптимальными для получения экстракта. Трех- и четырехдневные эмбрионы имеют слишком малый размер и мягкую консистенцию, что затрудняет манипуляции по их извлечению. Для эмбрионов на более поздних сроках наблюдается большая дифференциация тканей. Из оплодотворенных яиц было извлечено 9 пятидневных эмбрионов. В результате их гомогенизации, очистки полученного лизата последовательными этапами центрифугирования и ферментативной обработки нуклеазой S7 был получен клеточный экстракт объемом 1.55 мл с оптической плотностью при 260 нм, равной 76 отн.ед./мл.

Для установления рабочей матрицы проведено последовательно пять реакций с различными мРНК в идентичных условиях. Все мРНК имели кэп на 5'-конце, несли ген репортерной люциферазы светлячка (*fluc*) между различными 5'- и 3'НТО, имели полиадениновую последовательность на 3'конце. Бицистронные мРНК также имели ген люциферазы *rluc* (транслирующийся кэп-зависимо) перед последовательностями IRES. Экспрессия этого гена используется в люминесцентных ферментативных системах с целентеразином в качестве субстрата, что не имеет отношения к проводимому эксперименту. Выбор таких регуляторных последовательностей мРНК обусловлен их успешным применением в других эукариотических бесклеточных системах. В качестве контроля использовали реакционную смесь с деионизированной водой вместо мРНК.

В результате измерения люминесценции продуктов пяти реакций установлено, что синтез люциферазы произошел только в одном случае – НВА1-*fluc*-мРНК (рис. 1). Остальные варианты не отличались от контрольного. Вероятно, внутренняя (кэп-независимая) инициация невозможна в бесклеточной системе *Gallus gallus* в данных условиях для вирусных IRES, что, вероятно, связано с элементами вторичной структуры этих регионов. Кэп-зависимая инициация трансляции также не удалась, то есть можно считать, что 5'НТО гена белка β-актина человека является неподходящей в данной бесклеточной системе.

Испускание света в реакционной смеси с HBA1-*fluc*-мРНК было зафиксировано и стало экспоненциально расти через ~ 14 мин после начала реакции. Возможно, это время необходимо для прогрева реакционной смеси в планшете и наработки достаточного для регистрации сигнала количества люциферазы. Судя по графику (рис. 1), реакция продолжается в течение всего периода измерения (60 мин). Форма кривой совпадает с полученными ранее в экспериментах с сопряженной БСТ на основе клеточного экстракта *S. aureus* [35].

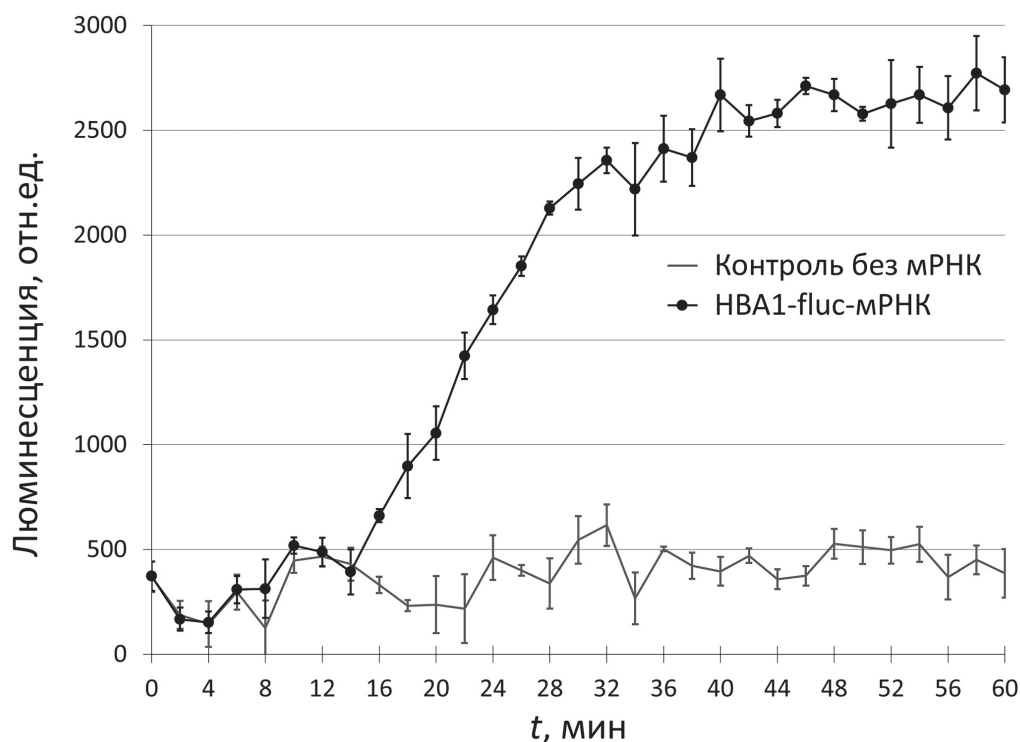


Рис. 1. Кинетика биосинтеза люциферазы с матрицы HBA1-*fluc*-мРНК в бесклеточной системе трансляции на основе клеточного экстракта эмбрионов *G. gallus*

Fig. 1. Kinetics of the firefly luciferase biosynthesis in a cell-free translation system based on the cell extract of *Gallus gallus* embryos with HBA1-*fluc*-mRNA template

Разработанный способ и зарегистрированные значения люминесценции в БСТ на основе клеточного экстракта эмбрионов *Gallus gallus* можно использовать как основу для дальнейших исследований по оптимизации количества компонентов в реакционной смеси (особенно K^+ , Mg^{2+} , и экстракта), а также для поиска оптимальных мРНК и IRES-регионов. Также существует возможность использования системы флуоресценции GFP в качестве репортерной.

Заключение

В результате исследования разработан протокол получения клеточного экстракта из эмбрионов домашних кур *Gallus gallus*, подобраны состав реакционной смеси и условия реакции трансляции *in vitro*, произведены подбор мРНК и реакция бесклеточного биосинтеза люциферазы в химически дополненном клеточном экстракте. Установлено, что для получения клеточного экстракта следует использовать пятидневные эмбрионы, 5'-кэпированная монокистронная мРНК с геном люциферазы светлячка *fluc*, 5'- и 3'-НТО гена $\alpha 1$ -субъединицы гемоглобина человека и полиадениновой последовательностью на 3'-конце (HBA1-*fluc*-мРНК) применима для бесклеточной системы на основе клеточного

экстракта эмбрионов *Gallus gallus*, а найденные экспериментально состав реакционной смеси и условия реакции обеспечивают успешный бесклеточный синтез белка.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

Литература

1. *Spirin A.S., Swartz J.R.* (Eds.) Cell-Free Protein Synthesis: Methods and Protocols. Weinheim: Wiley-VCH, 2008. 262 p.
2. *Chong S.* Overview of cell-free protein synthesis: Historic landmarks, commercial systems, and expanding applications // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2014. V. 108. P. 16.30.1–16.30.11. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1630s108>.
3. *Nevin D.E., Pratt J.M.* A coupled in vitro transcription-translation system for the exclusive synthesis of polypeptides expressed from the T7 promoter // *FEBS Lett.* 1991. V. 291, No 2. P. 259–263. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)81297-L](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)81297-L).
4. *Craig D., Howell M.T., Gibbs C.L., Hunt T., Jackson R.J.* Plasmid cDNA-directed protein synthesis in a coupled eukaryotic in vitro transcription-translation system // *Nucleic Acids Res.* 1992. V. 20, No 19. P. 4987–4995. <https://doi.org/10.1093/nar/20.19.4987>.
5. *Tuckey C., Asahara H., Zhou Y., Chong S.* Protein synthesis using a reconstituted cell-free system // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2014. V. 108. P. 16.31.1–16.31.22. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1631s108>.
6. *Zamecnik P.C., Frantz I.D., Loftfield R.B., Stephenson M.L.* Incorporation in vitro of radioactive carbon from carboxyl-labeled DL-alanine and glycine into proteins of normal and malignant rat livers // *J. Biol. Chem.* 1948. V. 175, No 1. P. 299–314. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)57260-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)57260-4).
7. *Smolskaya S., Logashina Y.A., Andreev Y.A.* *Escherichia coli* extract-based cell-free expression system as an alternative for difficult-to-obtain protein biosynthesis // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21, No 3. Art. 928. <https://doi.org/10.3390/ijms21030928>.
8. *Burgenson D., Gurramkonda C., Pilli M., Ge X., Andar A., Kostov Y., Tolosa L., Rao G.* Rapid recombinant protein expression in cell-free extracts from human blood // *Sci. Rep.* 2018. V. 8, No 1. Art. 9569. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27846-8>.
9. *Brödel A.K., Sonnabend A., Kubick S.* Cell-free protein expression based on extracts from CHO cells // *Biotechnol. Bioeng.* 2014. V. 111, No 1. P. 25–36. <https://doi.org/10.1002/bit.25013>.
10. *Stech M., Quast R.B., Sachse R., Schulze C., Wüstenhagen D.A., Kubick S.* A continuous-exchange cell-free protein synthesis system based on extracts from cultured insect cells // *PloS One.* 2014. V. 9, No 5. Art. e96635. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096635>.
11. *Madin K., Sawasaki T., Ogasawara T., Endo Y.* A highly efficient and robust protein synthesis system prepared from wheat embryos: Plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97, No 2. P. 559–564. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.559>.
12. *Stavnezer J., Huang R.C.C.* Synthesis of a mouse immunoglobulin light chain in a rabbit reticulocyte cell-free system // *Nat. New Biol.* 1971. V. 230, No 14. P. 172–176. <https://doi.org/10.1038/newbio230172a0>.
13. *Mikami S., Masutani M., Sonenberg N., Yokoyama S., Imataka H.* An efficient mammalian cell-free translation system supplemented with translation factors // *Protein Expression Purif.* 2006. V. 46, No 2. P. 348–357. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.09.021>.
14. *Gan R., Jewett M.C.* A combined cell-free transcription-translation system from *Saccharomyces cerevisiae* for rapid and robust protein synthesis // *Biotechnol. J.* 2014. V. 9, No 5. P. 641–651. <https://doi.org/10.1002/biot.201300545>.

15. Klammt C., Löhr F., Schäfer B., Haase W., Dötsch V., Rüterjans H., Glaubitz C., Bernhard F. High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins // *Eur. J. Biochem.* 2004. V. 271, No 3. P. 568–580. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2003.03959.x>.
16. Kalmbach R., Chizhov I., Schumacher M.C., Friedrich T., Bamberg E., Engelhard M. Functional cell-free synthesis of a seven helix membrane protein: *In situ* insertion of bacteriorhodopsin into liposomes // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 371, No 3. P. 639–648. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.087>.
17. Garenne D., Haines M.C., Romantseva E.F., Freemont P., Strychalski E.A., Noireaux V. Cell-free gene expression // *Nat. Rev. Methods Primers.* 2021. V. 1, No 1. Art. 49. <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00046-x>.
18. Sato W., Rasmussen M., Deich C., Engelhart A.E., Adamala K.P. Expanding luciferase reporter systems for cell-free protein expression // *Sci. Rep.* 2022. V. 12, No 1. Art. 11489. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15624-6>.
19. Thornton E.L., Paterson S.M., Stam M.J., Wood C.W., Laohakunakorn N., Regan L. Applications of cell free protein synthesis in protein design // *Protein Sci.* 2024. V. 33, No 9. Art. e5148. <https://doi.org/10.1002/pro.5148>.
20. Maharjan A., Par J.-H. Cell-free protein synthesis system: A new frontier for sustainable biotechnology-based products // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2023. V. 70, No 6. P. 2136–2149. <https://doi.org/10.1002/bab.2514>.
21. Brödel A.K., Sonnabend A., Roberts L.O., Stech M., Wüstenhagen D.A., Kubick S. IRES-mediated translation of membrane proteins and glycoproteins in eukaryotic cell-free systems // *PLoS One.* 2013. V. 8, No 12. Art. e82234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082234>.
22. Arduengo M., Schenborn E., Hurst R. The role of cell-free rabbit reticulocyte expression systems in functional proteomics // Kudlicki W., Katzen F., Bennett R. (Eds.) *Cell-Free Expression*. Austin, TX: Landes Biosci., 2007. P. 1–18.
23. Sword T.T., Abbas G.S.K., Bailey C.B. Cell-free protein synthesis for nonribosomal peptide synthetic biology // *Front. Nat. Prod.* 2024. V. 3. Art. 1353362. <https://doi.org/10.3389/fntpr.2024.1353362>.
24. Abreu R., Semedo-Lemsaddek T., Cunha E., Tavares L., Oliveira M. Antimicrobial drug resistance in poultry production: Current status and innovative strategies for bacterial control // *Microorganisms.* 2023. V. 11, No 4. Art. 953. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040953>.
25. Rodrigues G., Santos L.S., Franco O.L. Antimicrobial peptides controlling resistant bacteria in animal production // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. Art. 874153. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.874153>.
26. Nurullina L., Terrosu S., Myasnikov A.G., Jenner L.B., Yusupov M. Cryo-EM structure of the inactive ribosome complex accumulated in chick embryo cells in cold-stress conditions // *FEBS Lett.* 2024. V. 598, No 5. P. 537–547. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14831>.
27. Усачев К.С., Голубев А.А., Александрова Н.М., Ключкова Э.А., Бикмуллин А.Г., Валидов Ш.З., Юсупов М.М. Бесклеточная система синтеза белка на основе эмбриональных клеток *Gallus gallus* и способ синтеза белка на основе бесклеточной системы синтеза белка эмбриональных клеток // Патент РФ на изобретение № 2807690. 2023. Бюл. ФИПС № 33.
28. Brödel A.K., Wüstenhagen D.A., Kubick S. Cell-free protein synthesis systems derived from cultured mammalian cells // Owens R.J. (Ed.). *Structural Proteomics: High-Throughput Methods*. Ser.: *Methods in Molecular Biology*. V. 1261. New York, NY: Humana Press, 2015. P. 129–140. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2230-7_7.
29. Pelham H.R.B., Jackson R.J. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates // *Eur. J. Biochem.* 1976. V. 67, No 1. P. 247–256. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb10656.x>.
30. Fatkhullin B., Golubev A., Garaeva N., Validov S., Gabdulkhakov A., Yusupov M. Y98 mutation leads to the loss of RsfS anti-association activity in *Staphylococcus aureus* // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23, No 18. Art. 10931. <https://doi.org/10.3390/ijms231810931>.

31. Lintner N.G., McClure K.F., Petersen D., Londregan A.T., Piotrowski D.W., Wei L., Xiao J., Bolt M., Loria P.M., Maguire B., Geoghegan K.F., Huang A., Rolph T., Liras S., Doudna J.A., Dullea R.J., Cate J.H.D. Selective stalling of human translation through small-molecule engagement of the ribosome nascent chain // *PLoS Biol.* 2017. V. 15, No 3. Art. E2001882. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001882>.
32. Andreev D.E., Dmitriev S.E., Terenin I.M., Prassolov V.S., Merrick W.C., Shatsky I.N. Differential contribution of the m⁷G-cap to the 5' end-dependent translation initiation of mammalian mRNAs // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37, No 18. P. 6135–6147. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp665>.
33. Lidsky P.V., Yuan J., Lashkevich K.A., Dmitriev S.E., Andino R. Monitoring integrated stress response in live *Drosophila* // *bioRxiv* [Preprint]. 2023. <https://doi.org/10.1101/2023.07.13.548942>.
34. Panova E.A., Kleymenov D.A., Shcheblyakov D.V., Bykonina E.N., Mazunina E.P., Dzharullaeva A.S., Zolotar A.N., Derkaev A.A., Esmagambetov I.B., Sorokin I.I., Usachev E.V., Noskov A.N., Ivanov I.A., Zatsepin T.S., Dmitriev S.E., Gushchin V.A., Naroditsky B.S., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. Single-domain antibody delivery using an mRNA platform protects against lethal doses of botulinum neurotoxin A // *Front. Immunol.* 2023. V. 14. Art. 1098302. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1098302>.
35. Golubev A. Structural and functional studies of *S. aureus* translation machinery: PhD thesis. Univ. of Strasbourg, 2021. P. 79–93.

References

1. Spirin A.S., Swartz J.R. (Eds.) *Cell-Free Protein Synthesis: Methods and Protocols*. Weinheim, Wiley-VCH, 2008. 262 p.
2. Chong S. Overview of cell-free protein synthesis: Historic landmarks, commercial systems, and expanding applications. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 2014, vol. 108, pp. 16.30.1–16.30.11. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1630s108>.
3. Nevin D.E., Pratt J.M. A coupled in vitro transcription-translation system for the exclusive synthesis of polypeptides expressed from the T7 promoter. *FEBS Lett.*, 1991, vol. 291, no. 2, pp. 259–263. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)81297-L](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)81297-L).
4. Craig D., Howell M.T., Gibbs C.L., Hunt T., Jackson R.J. Plasmid cDNA-directed protein synthesis in a coupled eukaryotic in vitro transcription-translation system. *Nucleic Acids Res.*, 1992, vol. 20, no. 19, pp. 4987–4995. <https://doi.org/10.1093/nar/20.19.4987>.
5. Tuckey C., Asahara H., Zhou Y., Chong S. Protein synthesis using a reconstituted cell-free system. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 2014, vol. 108, pp. 16.31.1–16.31.22. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1631s108>.
6. Zamecnik P.C., Frantz I.D., Loftfield R.B., Stephenson M.L. Incorporation in vitro of radioactive carbon from carboxyl-labeled DL-alanine and glycine into proteins of normal and malignant rat livers. *J. Biol. Chem.*, 1948, vol. 175, no. 1, pp. 299–314. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)57260-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)57260-4).
7. Smolskaya S., Logashina Y.A., Andreev Y.A. *Escherichia coli* extract-based cell-free expression system as an alternative for difficult-to-obtain protein biosynthesis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, no. 3, art. 928. <https://doi.org/10.3390/ijms21030928>.
8. Burgenson D., Gurramkonda C., Pilli M., Ge X., Andar A., Kostov Y., Tolosa L., Rao G. Rapid recombinant protein expression in cell-free extracts from human blood. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, no. 1, art. 9569. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27846-8>.
9. Brödel A.K., Sonnabend A., Kubick S. Cell-free protein expression based on extracts from CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 2014, vol. 111, no. 1, pp. 25–36. <https://doi.org/10.1002/bit.25013>.
10. Stech M., Quast R.B., Sachse R., Schulze C., Wüstenhagen D.A., Kubick S. A continuous-exchange cell-free protein synthesis system based on extracts from cultured insect cells. *PloS One*, 2014, vol. 9, no. 5, art. e96635. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096635>.

11. Madin K., Sawasaki T., Ogasawara T., Endo Y. A highly efficient and robust protein synthesis system prepared from wheat embryos: Plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, vol. 97, no. 2, pp. 559–564. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.559>.
12. Stavnezer J., Huang R.C.C. Synthesis of a mouse immunoglobulin light chain in a rabbit reticulocyte cell-free system. *Nat. New Biol.*, 1971, vol. 230, no. 14, pp. 172–176. <https://doi.org/10.1038/newbio230172a0>.
13. Mikami S., Masutani M., Sonenberg N., Yokoyama S., Imataka H. An efficient mammalian cell-free translation system supplemented with translation factors. *Protein Expression Purif.*, 2006, vol. 46, no. 2, pp. 348–357. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.09.021>.
14. Gan R., Jewett M.C. A combined cell-free transcription-translation system from *Saccharomyces cerevisiae* for rapid and robust protein synthesis. *Biotechnol. J.*, 2014, vol. 9, no. 5, pp. 641–651. <https://doi.org/10.1002/biot.201300545>.
15. Klammt C., Löhr F., Schäfer B., Haase W., Dötsch V., Rüterjans H., Glaubitz C., Bernhard F. High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins. *Eur. J. Biochem.*, 2004, vol. 271, no. 3, pp. 568–580. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2003.03959.x>.
16. Kalmbach R., Chizhov I., Schumacher M.C., Friedrich T., Bamberg E., Engelhard M. Functional cell-free synthesis of a seven helix membrane protein: *In situ* insertion of bacteriorhodopsin into liposomes. *J. Mol. Biol.*, 2007, vol. 371, no. 3, pp. 639–648. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.087>.
17. Garenne D., Haines M.C., Romantseva E.F., Freemont P., Strychalski E.A., Noireaux V. Cell-free gene expression. *Nat. Rev. Methods Primers*, 2021, vol. 1, no. 1, art. 49. <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00046-x>.
18. Sato W., Rasmussen M., Deich C., Engelhart A.E., Adamala K.P. Expanding luciferase reporter systems for cell-free protein expression. *Sci. Rep.*, 2022, vol. 12, no. 1, art. 11489. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15624-6>.
19. Thornton E.L., Paterson S.M., Stam M.J., Wood C.W., Laohakunakorn N., Regan L. Applications of cell free protein synthesis in protein design. *Protein Sci.*, 2024, vol. 33, no. 9, art. e5148. <https://doi.org/10.1002/pro.5148>.
20. Maharjan A., Par J.-H. Cell-free protein synthesis system: A new frontier for sustainable biotechnology-based products. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2023, vol. 70, no. 6, pp. 2136–2149. <https://doi.org/10.1002/bab.2514>.
21. Brödel A.K., Sonnabend A., Roberts L.O., Stech M., Wüstenhagen D.A., Kubick S. IRES-mediated translation of membrane proteins and glycoproteins in eukaryotic cell-free systems. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 12, art. e82234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082234>.
22. Arduengo M., Schenborn E., Hurst R. The role of cell-free rabbit reticulocyte expression systems in functional proteomics. In: Kudlicki W., Katzen F., Bennett R. (Eds.) *Cell-Free Expression*. Austin, TX, Landes Biosci., 2007, pp. 1–18.
23. Sword T.T., Abbas G.S.K., Bailey C.B. Cell-free protein synthesis for nonribosomal peptide synthetic biology. *Front. Nat. Prod.*, 2024, vol. 3, art. 1353362. <https://doi.org/10.3389/fntpr.2024.1353362>.
24. Abreu R., Semedo-Lemsaddek T., Cunha E., Tavares L., Oliveira M. Antimicrobial drug resistance in poultry production: Current status and innovative strategies for bacterial control. *Microorganisms*, 2023, vol. 11, no. 4, art. 953. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040953>.
25. Rodrigues G., Santos L.S., Franco O.L. Antimicrobial peptides controlling resistant bacteria in animal production. *Front. Microbiol.*, 2022, vol. 13, art. 874153. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.874153>.
26. Nurullina L., Terrosu S., Myasnikov A.G., Jenner L.B., Yusupov M. Cryo-EM structure of the inactive ribosome complex accumulated in chick embryo cells in cold-stress conditions. *FEBS Lett.*, 2024, vol. 598, no. 5, pp. 537–547. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14831>.
27. Usachev K.S., Golubev A.A., Aleksandrova N.M., Klochkova E.A., Bikmullin A.G., Validov Sh.Z., Isusupov M.M. A cell-free protein synthesis system based on *Gallus gallus* embryonic cells and

- a method of protein synthesis based on cell-free protein synthesis system in embryonic cells. Patent RF no. 2807690. *Byull. FIPS*, 2023, no. 33. (In Russian)
28. Brödel A.K., Wüstenhagen D.A., Kubick S. Cell-free protein synthesis systems derived from cultured mammalian cells. In: Owens R.J. (Ed.) *Structural Proteomics: High-Throughput Methods*. Ser.: Methods in Molecular Biology. Vol. 1261. New York, NY, Humana Press, 2015, pp. 129–140. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2230-7_7.
 29. Pelham H.R.B., Jackson R.J. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.*, 1976, vol. 67, no. 1, pp. 247–256. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb10656.x>.
 30. Fatkhullin B., Golubev A., Garaeva N., Validov S., Gabdulkhakov A., Yusupov M. Y98 mutation leads to the loss of RsfS anti-association activity in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, vol. 23, no. 18, art. 10931. <https://doi.org/10.3390/ijms231810931>.
 31. Lintner N.G., McClure K.F., Petersen D., Londregan A.T., Piotrowski D.W., Wei L., Xiao J., Bolt M., Loria P.M., Maguire B., Geoghegan K.F., Huang A., Rolph T., Liras S., Doudna J.A., Dullea R.J., Cate J.H.D. Selective stalling of human translation through small-molecule engagement of the ribosome nascent chain. *PLoS Biol.*, 2017, vol. 15, no. 3, art. E2001882. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001882>.
 32. Andreev D.E., Dmitriev S.E., Terenin I.M., Prassolov V.S., Merrick W.C., Shatsky I.N. Differential contribution of the m⁷G-cap to the 5' end-dependent translation initiation of mammalian mRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 2009, vol. 37, no. 18, pp. 6135–6147. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp665>.
 33. Lidsky P.V., Yuan J., Lashkevich K.A., Dmitriev S.E., Andino R. Monitoring integrated stress response in live *Drosophila*. bioRxiv (Preprint). 2023. <https://doi.org/10.1101/2023.07.13.548942>.
 34. Panova E.A., Kleymenov D.A., Shcheblyakov D.V., Bykonina E.N., Mazunina E.P., Dzharullaeva A.S., Zolotar A.N., Derkaev A.A., Esmagambetov I.B., Sorokin I.I., Usachev E.V., Noskov A.N., Ivanov I.A., Zatsepin T.S., Dmitriev S.E., Gushchin V.A., Naroditsky B.S., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. Single-domain antibody delivery using an mRNA platform protects against lethal doses of botulinum neurotoxin A. *Front. Immunol.*, 2023, vol. 14, art. 1098302. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1098302>.
 35. Golubev A. Structural and functional studies of *S. aureus* translation machinery. *PhD thesis*. Univ. of Strasbourg, 2021, pp. 79–93.

Информация об авторах

Айдар Галимзанович Бикмуллин, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ Структурная биология, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет

E-mail: aydar.bikmullin@gmail.com

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7146-3289>

Эвелина Андреевна Ключкова, старший научный сотрудник лаборатории структурного анализа биомакромолекул, ФИЦ «Казанский научный центр Российской академии наук»

E-mail: evelina.klochkova@gmail.com

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0513-576X>

Наталья Михайловна Александрова, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических и микробиологических методов, ФИЦ «Казанский научный центр Российской академии наук»

E-mail: natalya5566@yandex.ru

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8131-2855>

Константин Сергеевич Усачев, доктор физико-математических наук, заведующий лабораторией структурного анализа биомакромолекул, ФИЦ «Казанский научный центр Российской академии наук»

E-mail: k.usachev@knc.ru

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6331-7764>

Author Information

Aydar G. Bikmullin, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Structural Biology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University

E-mail: *aydar.bikmullin@gmail.com*

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7146-3289>

Evelina A. Klochkova, Senior Researcher, Laboratory for Structural Analysis of Biomacromolecules, FRC Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences

E-mail: *evelina.klochkova@gmail.com*

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0513-576X>

Natalya M. Alexandrova, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Genetics and Microbiological Methods, FRC Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences

E-mail: *natalya5566@yandex.ru*

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8131-2855>

Konstantin S. Usachev, Dr. Sci. (Physics and Mathematics), Head of the Laboratory for Structural Analysis of Biomacromolecules, FRC Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences

E-mail: *k.usachev@knc.ru*

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6331-7764>

Поступила в редакцию 21.12.2024

Принята к публикации 20.01.2025

Received December 21, 2024

Accepted January 20, 2025