

УДК 579.842.11+579.66:577.15

А. С. ЩЕКОЛОВА, Д. С. РАДЕВИЧ, А. Н. РЫМКО, С. В. КВАЧ, А. И. ЗИНЧЕНКО

СОЗДАНИЕ НАБОРА ВЕКТОРОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ РАСТВОРИМОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, e-mail: zinch@mbio.bas-net.by

(Поступила в редакцию 24.07.2014)

Введение. Продукция природных и модифицированных белков в специально сконструированных для этой цели рекомбинантных штаммах *Escherichia coli* является в настоящее время основным этапом биотехнологического получения многих хозяйственно важных продуктов [1–3]. Однако, несмотря на удобства работы с клетками *E. coli* [4], многие бактериальные и эукариотические белки продуцируются в них в форме так называемых тел включения – водонерастворимых белковых агрегатов [5–7].

Тела включения солюбилизируют используя высокие концентрации хаотропных солей, и затем рефолдируют до нативного состояния с использованием разнообразных приемов [8–12]. К сожалению, эти процедуры характеризуются плохой воспроизводимостью и часто низкими выходами целевых рекомбинантных белков, продуцируемых *E. coli* [13, 14].

Данное препятствие может в значительной степени быть преодолено путем создания химерных конструкций, содержащих кроме целевого белка также белки-партнеры, позволяющие управлять его растворимостью [15, 16]. Тем не менее для оптимизации уровня синтеза белка и его растворимости исследователю приходится эмпирически перебирать множество вариантов.

Целью настоящей работы явилось создание набора унифицированных векторов для повышения растворимости целевого белка путем его слияния с различными белками-партнерами (глутатион-S-трансферазой и дисульфидизомеразой *E. coli*).

Объекты и методы исследования. Источником гена *DsbC*, кодирующего дисульфидизомеразу (Gene ID: 947363), служила хромосомная ДНК *E. coli*. На первом этапе ген *DsbC* выделяли используя полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с помощью «Phusion High-Fidelity»-ДНК-полимеразы и пары олигонуклеотидных праймеров: 42DsbC-F (5'-ТТААГААГГГАТАТАСАТ АТГААГАААГГТТТТТТАТГТТГТТТАС-3') и 42DsbC-R (5'-ГТТГТГГАССАССАСССГТГГТ САТТТТТТГГТ-3'). При этом на 5'-конец праймера 42DsbC-F была добавлена нуклеотидная последовательность, комплементарная вектору pET42a(+) (выделена подчеркиванием), а на 3'-конец праймера 42DsbC-R добавлена последовательность, кодирующая олигопептидный «мостик», который в дальнейшем будет соединять целевой белок с белком-партнером (здесь и далее выделена полужирным шрифтом). Амплификацию осуществляли по следующей программе: этап предденатурации 2 мин при 95 °С; 25 циклов амплификации – 10 с при 95 °С, 10 с при 60 °С, 40 с при 72 °С; финальная элонгация – 2 мин при 72 °С.

На втором этапе линейаризовали вектор pET42a(+) методом ПЦР с использованием «Phusion High-Fidelity»-ДНК-полимеразы и двух олигонуклеотидных праймеров: pET42lin-F (5'-GAGC АТСАССАТСАССАССАССАССАСТААТТГ-3') и 42Int-R (5'-ГТТГТГГАССАССАССАТАТГ ТАТАТСТССТТСТТ-3'). Амплификацию вектора осуществляли по следующей программе: этап предденатурации 2 мин при 95 °С; 25 циклов амплификации – 10 с при 95 °С, 10 с при 50 °С, 3 мин 30 с при 72 °С; финальная элонгация – 5 мин при 72 °С.

Для конструирования вектора, позволяющего получать химерные белки, содержащие в качестве белка-партнера глутатион-S-трансферазу *E. coli*, вектор pET42a(+) линейаризовали методом ПЦР в описанных выше условиях, однако вместо праймера 42Int-R использовали праймер 42Gst-Int-R (5'-GTTGTGGACCACCCTGGAGGATGGTCGC-3').

Вектор, позволяющий получать химерные белки, содержащие в качестве белка-партнера дисульфидизомеразу *E. coli*, собирали с помощью ПЦР, при этом линейаризованный вектор pET42a(+) и фрагмент ДНК, содержащий ген *DsbC* с дополнительной последовательностью нуклеотидов, комплементарной целевому вектору, отжигали друг на друга и проводили амплификацию по следующей программе: этап предденатурации 2 мин при 95 °С; 5 циклов амплификации – 10 с при 95 °С, 10 с при 50 °С, 4 мин при 72 °С; финальная элонгация – 5 мин при 72 °С. Далее в реакционную смесь вносили по 10 пмоль праймеров pET42lin-F и 42DsbC-R и проводили 15 циклов амплификации по той же программе.

Все полученные фрагменты ДНК анализировали посредством электрофореза в 0,8–1,5%-ном агарозном геле.

Результаты и их обсуждение. Для подбора оптимального белка-партнера, повышающего растворимость целевого полипептида и при этом не снижающего его активность и уровень синтеза в клетках штамма-продуцента, исследователям необходимо создать серию плазмидных векторов. Наиболее часто применяемые для получения таких генетических конструкций методы включают многочисленные этапы, такие как подготовка и рестрикция вектора, получение, очистка и рестрикция гена, лигирование и трансформация.

Применение нового метода лигазо-независимого клонирования, основанного на использовании ПЦР, имеет следующие преимущества: простоту (используется только один фермент – термостабильная ДНК-полимераза), быстроту (клонирование можно осуществить в течение 1–2 рабочих дней) и высокую «пропускную способность» (в 1 вектор можно одновременно клонировать библиотеки мутантных генов). Данный подход базируется на удлинении перекрывающихся последовательностей вектора и «вставки», в результате чего получается кольцевая молекула, содержащая необходимый ген в составе плазмиды [17].

Для создания набора унифицированных (позволяющих клонировать целевой ген во все векторы набора с использованием всего 1 пары олигонуклеотидных праймеров) была выбрана плаزمида pET42a(+), позволяющая не только эффективно экспрессировать целевые гены благодаря сильному T7-промотору, но и добавлять на С-конец целевых белков октагистиридиновый олигопептид, с помощью которого возможно проведение одноэтапной очистки белка с использованием металло-аффинной хроматографии.

В качестве белков-партнеров были выбраны глутатион-S-трансфераза и дисульфидизомеразу *E. coli*, которые, согласно литературным данным, значительно повышают растворимость целевых белков [18, 19].

На первом этапе работы с использованием ПЦР получены линейные плазмидные векторы pET42lin-Int (позволяющий получать целевой белок без белков-партнеров) и pET42lin-Gst-Int (позволяющий получать химерную конструкцию целевого белка с глутатион-S-трансферазой). Процесс получения целевых векторов схематически представлен на рис. 1.

На следующем этапе с помощью ПЦР проведено выделение гена, кодирующего дисульфидизомеразу *E. coli*. Олигонуклеотидные праймеры были подобраны таким образом,

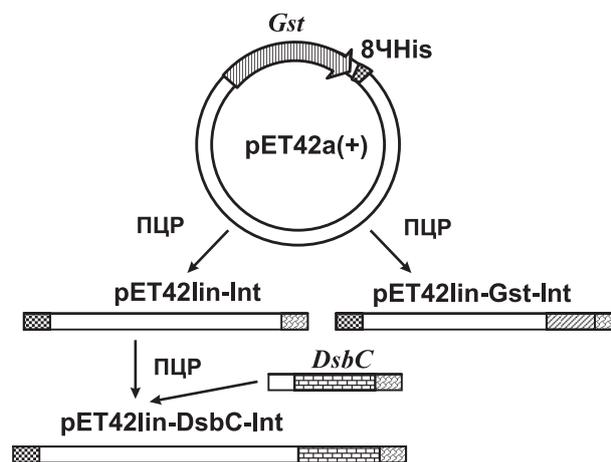


Рис. 1. Схема создания векторов:

▨ – последовательность нуклеотидов, кодирующая октагистиридиновый олигопептид; ▤ – ген, кодирующий дисульфидизомеразу *E. coli*; ▧ – ген, кодирующий глутатион-S-трансферазу *E. coli*; ▩ – последовательность нуклеотидов, кодирующая олигопептидный «мостик»

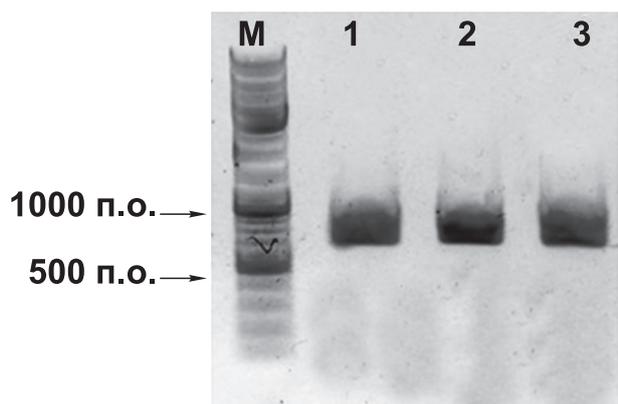


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации гена *DsbC* *E. coli*: M – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК; 1–3 – продукты ПЦР-амплификации гена *DsbC*

чтобы добавить на 5'-конец целевого гена последовательность нуклеотидов, комплементарную вектору pET42a(+), для последующего встраивания в вектор. Электрофореграмма полученного ПЦР-амплификата представлена на рис. 2.

Далее сконструирован вектор pET42lin-DsbC-Int (позволяющий получать химерную конструкцию целевого белка с дисульфидизомеразой) (рис. 1). Электрофореграмма полученных в настоящей работе линейаризованных векторных конструкций представлена на рис. 3.

Нуклеотидные последовательности полученных векторов подтверждены с помощью рестрикционного и ПЦР-анализа, а также путем их секвенирования (данные не приводятся).

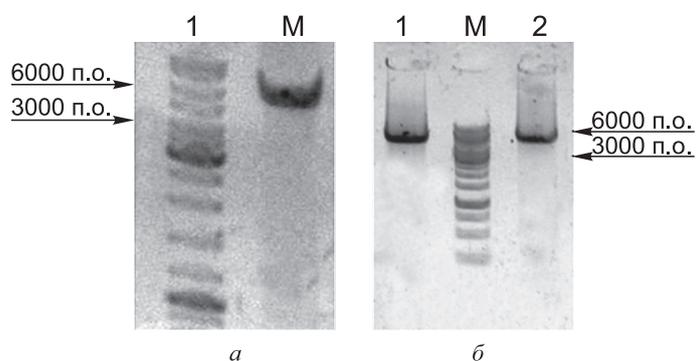


Рис. 3. Электрофореграмма линейаризованных плазмидных векторов: M – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК; а: 1 – вектор pET42lin-DsbC-Int; б: 1 – вектор pET42lin-Int; 2 – вектор pET42lin-Gst-Int

Следует отметить, что все линейаризованные векторы, полученные в настоящем исследовании, сконструированы таким образом, чтобы на их 3'- и 5'-концах они содержали идентичные последовательности нуклеотидов (последовательность, кодирующую октагистидиновый олигопептид на 3'-конце кодирующей цепи, и последовательность, кодирующую олигопептидный «мостик» на 5'-конце). Это позволит в дальнейшем встраивать целевой белок во все векторы набора методом лигазо-независимого клонирования с использованием всего одной пары олигонуклеотидных праймеров.

Заключение. В настоящей работе впервые создан набор унифицированных линейаризованных векторов для повышения растворимости целевого белка путем его слияния с различными белками-партнерами. Данный набор может быть использован для изучения возможности повышения растворимости целевых белков путем создания химерных белковых конструкций.

Литература

1. Зинченко А.И. // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. тр. Т. 2. Мн., 2009. С. 81–92.
2. Corchero J.L., Gasser B., Resina D. et al. // Biotechnol. Adv. 2013. Vol. 31, N2. P. 140–153.
3. Rosano G.L., Ceccarelli E.A. // Front Microbiol. 2014. Vol. 5. N 172.
4. Papaneophytou C.P., Kontopidis G. // Protein Expr. Purif. 2014. Vol. 94. P. 22–32.
5. Stormo G.D., Schneider T.D., Gold L.M. // Nucleic Acids Res. 1982. Vol. 10. P. 2971–2996.
6. Fahnert B., Lilie H., Neubauer P. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2004. Vol. 89. P. 93–142.
7. Korovashkina A.S., Rymko A.N., Kvach S.V., Zinchenko A.I. // J. Biotechnol. 2012. Vol. 164, N2. P. 276–280.
8. Dill K.A., Shortle D. // Annu. Rev. Biochem. 1991. Vol. 60. P. 795–825.

9. Tsumoto K., Ejima D., Kumagai I., Arakawa T. // *Protein Expr. Purif.* 2003. Vol. 28. P. 1–8.
10. Vallejo L. F., Rinas U. // *Microb. Cell Fact.* 2004. Vol. 3, N 11.
11. Burgess R. R. // *Methods Enzymol.* 2009. Vol. 463. P. 259–282.
12. Singh S. M., Sharma A., Upadhyay A. K. *et al.* // *Protein Expr. Purif.* 2012. Vol. 81, N 1. P. 75–82.
13. Datar R. V., Cartwright T., Rosen C. G. // *Biotechnol. (N.Y.)*. 1993. Vol. 11. P. 349–357.
14. Panda A. K. // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2003. Vol. 85. P. 43–93.
15. Berrow N. S., Bussow K., Coutard B. *et al.* // *Acta Crystall. D: Biol. Crystall.* 2006. Vol. 62, N 10. P. 1218–1226.
16. Chambers S. P., Swalley S. E. // *Methods Mol. Biol.* 2009. Vol. 498. P. 19–29.
17. You C., Zhang X. Z., Zhang Y. H. P. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. Vol. 78, N 5. P. 1593–1595.
18. Kurokawa Y., Yanagi H., Yura T. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. Vol. 66, N 9. P. 3960–3965.
19. Rabhi-Essafi I., Sadok A., Khalaf N., Fathallah D. M. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2007. Vol. 20, N 5. P. 201–209.

A. S. SHCHOKOLOVA, D. S. RADEVICH, A. N. RYMKO, S. V. KVACH, A. I. ZINCHENKO

CREATION THE SET OF VECTORS TO ENHANCE SOLUBILITY OF RECOMBINANT PROTEIN

Summary

A set of unified linearized vectors to improve the solubility of the target protein by its fusion with different partner proteins (glutathione-S-transferase, and disulfide isomerase of *Escherichia coli*) was constructed for the first time in this work. The kit may be used in studies to promote solubility of the target proteins by designing chimeric protein structures.