

УДК 579.66:577.15+577.113.3

А. Н. РЫМКО, С. В. КВАЧ, А. И. ЗИНЧЕНКО

ОДНОРЕАКТОРНЫЙ ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ДЕЗОКСИНУКЛЕОЗИДТРИФОСФАТОВ

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

(Поступила в редакцию 28.09.2013)

Введение. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и методы, лежащие в ее основе, широко используются в научных и диагностических лабораториях Республики Беларусь. Постановка ПЦР предусматривает применение дорогостоящих 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов (дНТФ), термостабильных ДНК-полимераз и других реагентов, поступающих в настоящее время в основном из-за рубежа. Создание технологии и организация отечественного производства биохимического инструментария для постановки ПЦР позволили бы снизить импорт аналогичных реагентов и предоставила возможность для разработки отечественных аналитических тест-систем с использованием собственной реактивной базы.

Как известно, предшественниками ДНК при синтезе ее с помощью ПЦР выступают четыре дНТФ: дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ. В настоящее время дНТФ получают как химическими, так и ферментативными методами. Химические методы имеют ряд существенных недостатков, в том числе низкий выход целевых продуктов и трудоемкость очистки, что сказывается на высокой себестоимости продукции [1–4].

В качестве альтернативы химическому синтезу дНТФ в литературе предложен ряд схем получения этих соединений с использованием ферментов. Самую простую, на наш взгляд, схему ферментативного получения дНТФ иллюстрирует рис. 1. Данная схема характеризуется следующими особенностями:

синтез дНТФ начинается с дезоксинуклеозида;

для синтеза всех четырех дНТФ используются неспецифические киназы;

в качестве донора фосфатной группы используется сравнительно доступный ацетилфосфат.

Первая стадия фосфорилирования осуществляется дезоксинуклеозидкиназой *Drosophila melanogaster* (ДН-киназа) [5, 6]. Вторая стадия катализируется дезоксинуклеозидмонофосфаткиназой бактериофага Т5 (дНМФ-киназа) [7, 8]. Третья стадия фосфорилирования осуществляется нуклеозиддифосфаткиназой *Escherichia coli* (НДФ-киназа) [9]. В регенеративной системе используются дАТФ (в качестве кофактора), ацетилфосфат (в качестве донора фосфатной группы) и ацетаткиназа *E. coli*, осуществляющая регенерацию кофактора [10].

Целью настоящей работы было создание схемы одnoreакторного синтеза дНТФ. Для достижения поставленной задачи предусматривалось конструирование штаммов-продуцентов рекомбинантных белков: ДН-киназы, дНМФ-киназы, НДФ-киназы и ацетаткиназы.

Материалы и методы исследования. Источником гена *dnk*, кодирующего ДН-киназу, служила геномная ДНК *D. melanogaster*. Источником гена дНМФ-киназы (*dnk*) служила геномная ДНК бактериофага Т5. Источником генов НДФ-киназы (*ndk*) и ацетаткиназы (*acka*) служила геномная ДНК *E. coli*. Геномную ДНК всех образцов выделяли фенол-хлороформным методом с дополнительной очисткой



Рис. 1. Схема ферментативного получения дНТФ

цетавлоном [11]. Гены выделяли с использованием ПЦР, *Pfu*-ДНК-полимеразы (Promega, США) и олигонуклеотидных праймеров (Праймтех, Беларусь), описанных в табл. 1.

Синтезированные с помощью ПЦР продукты обрабатывали смесью рестриктаз *NdeI* и *XhoI* (Fermentas, Литва) и лигировали с обработанной этими же ферментами плазмидной ДНК pET42a+ (Novagen, США). Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* DH5 α (Novagen, США), с последующим высевом на плотную селективную питательную среду Luria-Bertani (LB) [11] с канамицином (100 мкг/мл). Из нескольких выросших одиночных колоний выделяли плазмиды. С помощью ПЦР-скрининга определяли наличие в плазмиде гена в правильной ориентации. Созданными конструкциями трансформировали клетки *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, США). В результате получили следующие рекомбинантные штаммы: *E. coli* КНК-12/3 (продуцирует ДН-киназу *D. melanogaster*), *E. coli* pdnkT5 (продуцирует дНМФ-киназу бактериофага T5), *E. coli* pndkEc (продуцирует НДФ-киназу *E. coli*) и *E. coli* раскаEc (продуцирует ацетаткиназу *E. coli*). Все указанные белки содержат на С-конце молекулы дополнительный октагистидиновый олигопептид, позволяющий проводить одноэтапную очистку ферментов из клеточных лизатов с помощью металлоаффинной хроматографии.

Т а б л и ц а 1. Праймеры, использованные в работе

Праймер	Последовательность нуклеотидов (5'→3')
Dm-dnkF1	CAGTAACATATGGCGGAGGCAGCATCC
Dm-dnkR1	CGAAGCATAGCGAGCGCTAAAAATGGAGCG
Dm-dnkF2	TTAGCGCTCGCTATTGCTTCGTGGAGAACATGC
Dm-dnkR2	CGAGGACTAGGACCTTGCACGACTGCGGTC
Dm-dnkF3	TCGTGCAAGGTCCCTAGTCCCTCGATGCCGATCTG
Dm-dnkR3	ATCTCGAGTCTGGCGACCCCTGGC
T5-dnkF	TCGCTTCATATGTCAGTATTAGTCGGTTTACATGGTG
T5-dnkR	TCCTCGAGTCCAACCTAGTGGTTCTAGCTCTAAGTCA
ndkF	TTTAAGAAGGAGATATACATATGGCTATGAACGTACTT
ndkR	TGGTGATGGTGATGCTCACGGGTGCGCGGGCA
AckaF	CGTTCACATATGTCGAGTAAGTTAGTACTGGTTCTG
AckR	TGTATCTCGAGGGCAGTCAGGCGGCTC

Клетки-трансформанты выращивали до оптической плотности 0,6 ($\lambda = 600$ нм) и проводили индукцию синтеза белка 1 мМ изопропил- β -тиогалактопиранозидом (ИПТГ) и продолжали культивирование в течение 3 ч. После осаждения клеток центрифугированием их ресуспендировали в 50 мМ (натрий-фосфатным буфером) растворе NaH_2PO_4 , содержащем 300 мМ NaCl и 20 мМ имидазол (pH 8,0), и разрушали ультразвуком на приборе UDM-10 (Techpan, Польша) в следующих условиях: мощность – 0,5 кВт, при 4 °С в течение 5 мин. УЗ-лизат клеток центрифугировали при 20000 g в течение 30 мин и супернатант наносили на хроматографическую колонку со смолой Ni-NTA (Qiagen, США). Белки элюировали 50 мМ раствором NaH_2PO_4 , содержащим 300 мМ NaCl и 250 мМ имидазол (pH 8,0), контролируя процесс элюции с помощью ДСН-полиакриламидного гель-электрофореза. Фракции, содержащие целевые белки, объединяли и подвергали диализу против 10000 объемов 20 мМ Трис-ацетатного буфера, содержащего 100 мМ KCl, 2 мМ MgCl_2 и 1 мМ дитиотриэтол (pH 8,0).

Активность ДН-киназы, дНМФ-киназы, НДФ-киназы и ацетаткиназы определяли по скорости фосфорилирования дезокситимидина, дТМФ, дТДФ и АДФ соответственно. Реакционную смесь, содержащую 50 мМ Трис-HCl-буфер (pH 8,5), 15 мМ MgCl_2 , 100 мМ KCl, 5 мМ АТФ (ацетилфосфат в случае ацетаткиназы), 2 мМ субстрат и соответствующий фермент, инкубировали при 37 °С в течение 60 мин. Ход реакции контролировали с помощью ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое обеспечивало образование 1 мкмоль продукта за 1 мин протекания реакции.

Реакционная смесь для проведения препаративного синтеза дНТФ содержала 100 мМ Трис-HCl-буфер (pH 8), 10 мМ MgCl_2 , 1 мМ дАТФ, 20 мМ дезоксинуклеозид, 120 мМ ацетилфосфат, по 150 ед. ДН-киназы, дНМФ-киназы и НДФ-киназы, а также ацетаткиназу в количестве 450 ед.

Объем реакционной смеси составлял 0,5 л. За ходом реакции следили с помощью ионообменной ВЭЖХ. По ходу всей реакции контролировали pH реакционной смеси, так как при гидролизе ацетилфосфата происходит ее закисление.

Все цифровые данные, представленные в работе, являются усредненными величинами из 3–4 определений. Доверительный интервал среднего арифметического рассчитывали для 95%-ного уровня вероятности.

Результаты и их обсуждение. При конструировании рекомбинантных штаммов *E. coli*, продуцирующих киназы, все целевые гены были встроены в плазмиду pET42a+ под контролем сильного T7-промотора. К каждому из генов с 3'-конца кодирующей цепи была присоединена дополнительная нуклеотидная последовательность, кодирующая гистиридиновый октапептид, выполняющий роль аффинного домена. Полученными плазмидами трансформировали клетки *E. coli* BL21(DE3). В результате были созданы штаммы *E. coli*, продуцирующие: ДН-киназу *D. melanogaster* (*E. coli* КНК-12/3), дНМФ-киназу бактериофага T5 (*E. coli* pdnkT5), НДФ-киназу *E. coli* (*E. coli* pndkEc) и ацетаткиназу *E. coli* (*E. coli* paskaEc). При индукции синтеза рекомбинантных белков с применением 1 мМ ИПТГ содержание целевых белков в клетках составляло 31–62 % в зависимости от штамма-продуцента (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Характеристика бактериальных штаммов, продуцирующих киназы

Штамм (фермент)	Содержание фермента, %	Киназная активность	
		мг/л КЖ	ед/л КЖ
<i>E. coli</i> КНК-12/3 (ДН-киназа)	31±2	150±15	4500±390
<i>E. coli</i> pdnkT5 (дНМФ-киназа)	34±2	105±5	9200±450
<i>E. coli</i> pndkEc (НДФ-киназа)	50±4	250±25	(190±20)·10 ³
<i>E. coli</i> paskaEc (ацетаткиназа)	62±3	435±50	(1,7±0,2)·10 ⁶

Очистку рекомбинантных ферментов проводили методом аффинной хроматографии на смоле Ni-NTA. При этом следует подчеркнуть, что присоединение к генам дополнительных олигонуклеотидных последовательностей, кодирующих гистиридиновый октапептид, позволило получить высокоочищенные препараты белков со следующими выходами: 47 % для ацетаткиназы, 52 % для НДФ-киназы и по 60 % для ДН-киназы и дНМФ-киназы. При этом доля целевых белков в ферментных препаратах составила более 95 %.

Следующий раздел работы был посвящен оптимизации условий проведения одnoreакторного синтеза дНТФ. На первом этапе оптимизации синтеза дНТФ изучили влияние концентрации кофактора (АТФ) на эффективность реакции синтеза дГТФ. Для этого концентрацию АТФ в реакционной смеси изменяли в диапазоне 0,2–2 мМ и измеряли выход дГТФ из дезоксигуанозина, достигнутый за 4 ч протекания реакции при 37 °С. Результаты этого эксперимента представлены на рис. 2.

Как видно из рис. 2, максимальное количество дГТФ за 4 ч проведения реакции образуется при использовании АТФ в концентрации 1–2 мМ и соответствует 95–98 % выходу (в расчете на количество введенного в реакцию дезоксигуанозина). При более низких концентрациях АТФ скорость трансформации дезоксинуклеозидов в его трифосфат значительно снижается. Таким образом, наиболее подходящей концентрацией АТФ для проведения одnoreакторного синтеза дНТФ является концентрация 1 мМ; использование более высоких концентраций кофактора приводит к неоправданным затратам этого труднодоступного соединения.

На следующем этапе оптимизации синтеза дНТФ изучили влияние начальной концен-

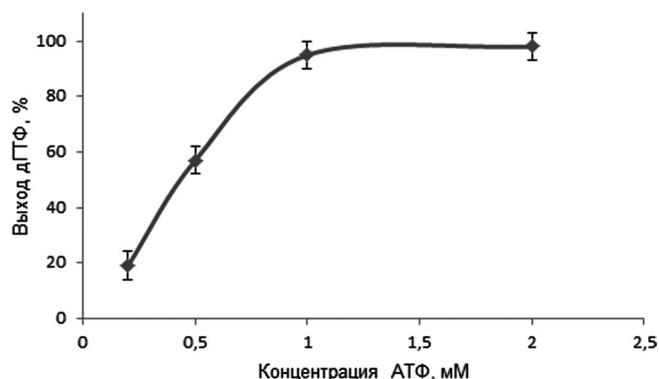


Рис. 2. Зависимость выхода дГТФ от концентрации АТФ

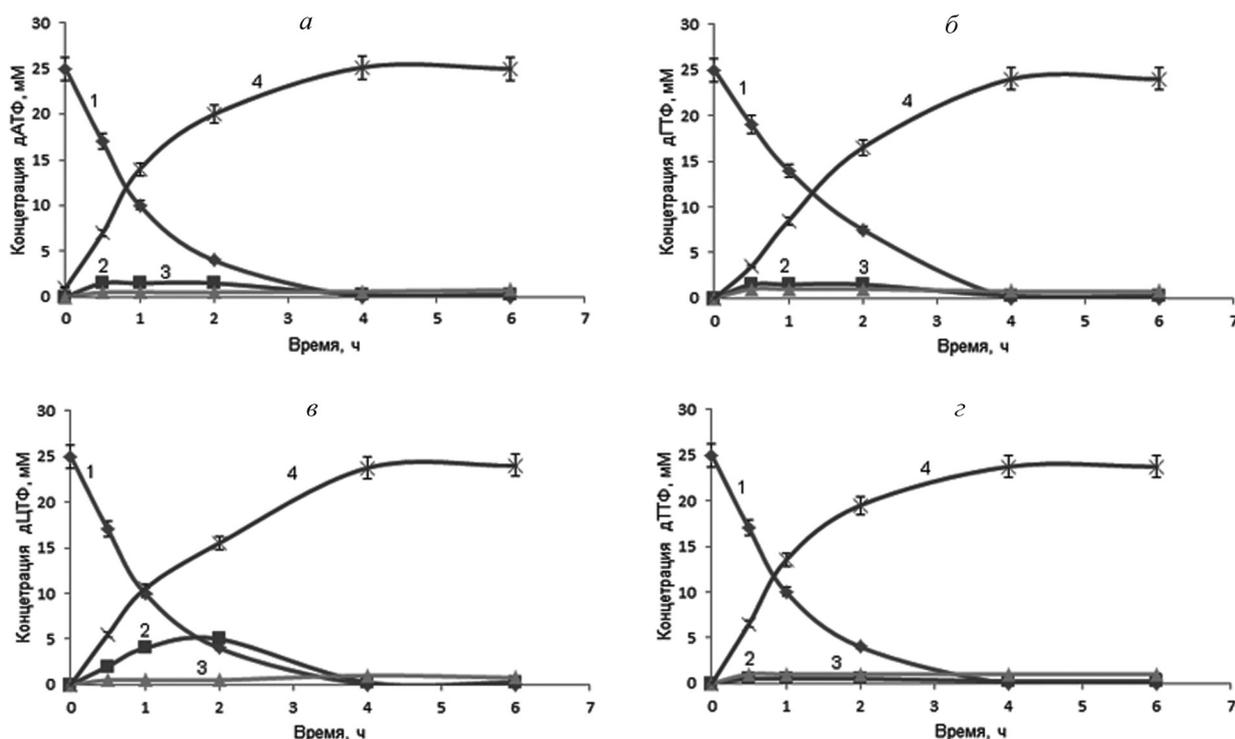


Рис. 3. Динамика накопления дНТФ при препаративном синтезе дАТФ (а), дГТФ (б), дЦТФ (в) и дТТФ (г): 1 – дезоксирибозид, 2 – дНМФ, 3 – дНДФ, 4 – дНТФ

трации дезоксирибозид (в диапазоне 10–40 мМ) на максимальный выход реакции. При этом процесс получения дНТФ моделировали на примере синтеза дГТФ из дезоксирибозидина. В результате было выяснено, что максимально возможная концентрация дезоксирибозидина, не влияющая на конечный выход дГТФ, составляет 25 мМ. При более высоких концентрациях наблюдается снижение выхода дНТФ.

Препаративный синтез дНТФ. На следующем этапе работы проводили препаративные синтезы всех четырех канонических дНТФ: дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ. Синтезы проводили при следующих условиях: 37 °С, рН 8,0, 10 мМ Mg^{2+} , 1 мМ АТФ, 25 мМ дезоксирибозид. Объем реакционной смеси составлял 0,5 л, выход целевого дНТФ – порядка 6 г. Динамика синтеза всех четырех дНТФ отражена на рис. 3.

Таким образом, полная конверсия всех четырех дезоксирибозидов в соответствующие дНТФ проходит за 4 ч. Уровень конверсии субстрата составляет 95–97 %. На протяжении всей реакции количество дНМФ и дНДФ остается на достаточно низком уровне. Исключением является лишь дЦМФ, который образуется на начальных стадиях реакции синтеза дЦТФ. Его накопление объясняется относительно низкой активностью дНМФ-киназы по отношению к дЦМФ.

Заключение. В клетках *E. coli* проведено клонирование генов, кодирующих ДН-киназу *D. melanogaster*, дНМФ-киназу бактериофага T5, гомологичные НД-киназу и ацетаткиназу. Получены рекомбинантные штаммы-продуценты перечисленных выше ферментов. В структуре данных белков имеются дополнительные гистидиновые октапептиды, позволяющие проводить выделение ферментов в одну стадию, используя одноэтапную очистку на аффинной смоле Ni-NTA. Выход процесса очистки составляет 47–60 % в зависимости от фермента, а доля целевых белков в ферментных препаратах – более 95 %. Показано, что оптимальная концентрация АТФ для проведения одноконтурного синтеза дНТФ составляет 1 мМ, а оптимальная начальная концентрация дезоксирибозидина – 25 мМ. Проведен препаративный синтез (около 6 г) всех четырех канонических дНТФ с выходом реакции 95–97 %. Время достижения максимального выхода – около 4 ч.

Работа выполнена в рамках задания 4.8 Межгосударственной целевой программы ЕвразЭС «Инновационные биотехнологии».

Литература

1. Chambers R., Khorana H. // J. Am. Chem. Soc. 1957. Vol. 79, N 14. P. 3752–3756.
2. Hoffmann C., Genieser H. G., Veron M., Jastorff B. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1996. Vol. 6, N 21. P. 2571–2574.
3. Borsenberger V., Kukwikila M., Howorka S. // Org. Biomol. Chem. 2009. Vol. 7, N 18. P. 3826–3835.
4. Caton-Williams J., Smith M., Carrasco N., Huang Z. // Organic Lett. 2011. Vol. 13, N 16. P. 4156–4159.
5. Johansson M., Van Rompay A. R., Degreve B. et al. // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274, N 34. P. 23814–23819.
6. Knecht W., Munch-Petersen B., Piskur J. // J. Mol. Biol. 2000. Vol. 301, N 4. P. 827–837.
7. Bessman M. J., Herriott S. T., van Bibber Orr M. J. // J. Biol. Chem. 1965, N 1. Vol. 240. P. 439–445.
8. Скоблов А. Ю., Микулинская Г. В., Таран С. А. и др. // Биоорган. химия. 2009. Т. 34, № 6. С. 816–821.
9. Bello L. J., Bessman M. J. // Biochim. Biophys. Acta. 1963. Vol. 72. P. 647–650.
10. Kakuda H., Hosono K., Shiroishi K., Ichihara S. // J. Biochem. 1994. Vol. 116. P. 916–922.
11. Sambrook J., Mac Callum P., Russell D. // Molecular cloning: a laboratory manual. N. Y., 2000.

A. N. RYMKO, S. V. KVACH, A. I. ZINCHENKO

ONE-POT ENZYMATIC SYNTHESIS OF DEOXYNUCLEOSIDE TRIPHOSPHATES

Summary

Using methods of genetic engineering strains *E. coli* producing deoxynucleoside kinase of *D. melanogaster*, deoxynucleoside monophosphate kinase of bacteriophage T5, homologous nucleoside-diphosphate kinase and acetate kinase, with additional C-terminal fusion polyhistidine oligopeptide were constructed. Four canonical deoxynucleoside triphosphates were synthesized using the recombinant enzymes. The yields of the reactions were 95–97 %. The conversion was completed within 4 h.