

mit gleitflächen aus Al₂O₃-keramic // Biomed. Tech. — 1980. — Vol. 25 — P. 165–168.

14. *Streicher R.M.* Tribologie künstlicher gelenke // In: Endoprothetik / Ed. by *E.W. Morscher* — Berlin-

Springer, 1995. — P. 38–53.

15. *Zichner L.P., Willert H.G.* Comparison of alumina-polyethylene and metal-polyethylene in clinical trials // Clin. Orthop. — 1992. — Vol. 282. — P. 86–94.

Поступила 17.11.2005

УДК 577.152.1.03:577.112.4:577.217:543.42

ПРЕИМУЩЕСТВА ПЕРИПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ И «КАССЕТНОГО» МУТАГЕНЕЗА В ТЕХНОЛОГИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

Ю.Г. Походня, Т.А. Скрягина, А.Г. Лапко

Международный государственный экологический университет им А.Д. Сахарова

Гомогенные, биологически активные фармакологические препараты могут быть получены практически в неограниченных количествах биотехнологическими методами. Технология получения рекомбинантных белков постоянно совершенствуется по направлениям повышения уровня экспрессии и сокращения стадий очистки протеина. Предложен метод однастадийного клонирования рекомбинантного His-Tag фьюжен адренодоксина с сохранением преимуществ вектора для периплазматической его экспрессии. Подобрана система детергентов для эффективного лизиса бактериальных клеток.

Ключевые слова: адренодоксин, клонирование, периплазматическая экспрессия, смесь детергентов, аффинная хроматография.

ADVANTAGES OF PERIPLASMATIC EXPRESSION AND «CASSETTE» MUTAGENESIS OF RECOMBINANT PROTEINS TECHNOLOGY

Y.G. Pohodnya, T.A. Skrahina, A.G. Lapko

International Sakharov Environmental University

Biotechnology methods allow getting homogenous biologically active preparations in virtually unlimited quantities. Recombinant protein purification technology is being constantly improved to increase expression level and minimization of number of protein purification stages. This paper introduces the new method of one-stage recombinant His-Tag fusion adrenodoxin cloning. It keeps all vector advantages for its periplasmatic expression. In this issue, optimized detergents system for effective lysis of bacteria cells has been described.

Key words: adrenodoxin, cloning, periplasmatic expreccion, detergent mixture, affinity Tag technologies.

Основными направлениями в развитии технологии получения рекомбинантных белков остаются поиск оптимальных условий экспрессии и совершенствование методов выделения протеинов. В качестве примера перспективных решений в этой области может служить использование аффинной хроматографии, специфической для каждого типа Tag фьюжен белков, в частности, металл-хелатной хроматографии, основанной на связывании His-Tag фьюжен протеинов с двухвалентными катионами металлов, иммобилизованными на

твердой матрице. Коммерческие векторные системы, позволяющие модифицировать нуклеотидную последовательность кДНК экспансией тринуклеотидов, ответственных за синтез шести и более гистидинов, необходимых для применения металл-хелатной хроматографии, как правило, сконструированы для цитоплазматической экспрессии, которая в ряде случаев приводит к резкому снижению выхода протеина из-за его протеолиза. В таких случаях деградацию рекомбинантного белка можно значительно уменьшить, если выбрать век-

отжиг праймеров при 55°C в течение 1 мин и ферментативная реакция при температуре 68°C в течение 8 мин. После синтеза некоторого количества кДНК из каждой реакционной смеси отбирали по 25 мкл и смешивали в общую пробирку, добавляли 1 уд. активности *Pfu* полимеразы и проводили 17 циклов ПЦР по стандартной схеме. Деструкцию исходной матрицы рККАdx проводили добавлением 10 ед. активности рестриктазы *DpnI* и инкубацией смеси 2 часа при 37°C.

Клонирование проводили, используя элетротрансформацию 5 мкл продуктов ПЦР в 50 мкл клеток *E. coli*, штамм Nova-Blue (DE3), с последующим посевом на агарозу с LB-средой, содержащей ампицилин. Скрининг положительных клонов осуществляли по картам рестрикции, выделенной плазмидной ДНК, в 1,5% агарозном геле. Вектор рККАdx-His^C, выделенный из положительных клонов, трансформировали в компетентные бактериальные клетки *E. coli*, штамма RL21(DE3).

Экспрессию и очистку рекомбинантного His-Tag фьюжен адренодоксина проводили из бактериальных клеток *E. coli*, штамм BL21(DE3), содержащих в первом случае вектор рЕТ28Adx-His^C, а во втором — обратный праймер, рККАdx-His^C. Клеточные культуры инкубировали в объемах 2×500 мл каждые при 37°C в течение 5–6 часов в LB-среде, содержащей канамицин

для вектора рЕТ28Adx-His^C и ампицилин для вектора рККАdx-His^C. После индукции синтеза белка 1 mM IPTG инкубацию продолжали в тех же условиях в течение еще 18 часов. Собранную центрифугированием биомассу из четырех образцов отдельно ресуспензировали в 50 мл свежеприготовленного 50 mM Трис/HCl буфера, pH 8.0. Все последующие процедуры проводили параллельно в абсолютно одинаковых условиях для четырех образцов. Для оптимизации лизиса клеток использовали подобранную нами систему детергентов (табл. 1), состоящую из 0,2% дезоксихолата натрия и 0,1% Твина. Разрушение клеточной стенки проводили добавлением 25 ед. активности лизоцима в течение 30 мин при комнатной температуре. Гидролиз геномной ДНК осуществляли добавлением 20 ед. активности ДНКазы I, с последующей инкубацией смеси при 4°C в течение 40 мин. Критерием полноты гидролиза было исчезновение вязкости раствора. Суспензию лизата центрифугировали 30 мин при 11000 об/мин, и супернатанты наносили на колонки с аффинной матрицей Ni-NTA, уравновешенные 50 mM Трис/HCl буфером, pH 8.0, содержащего 0.2M NaCl (буфер А). Неспецифическую сорбцию белков удаляли 30 mM имидазолом в буфере А. Адренодоксин элюировали с Ni-NTA 200 mM имидазолом в буфере А.

Таблица 1

Определение конечной концентрации детергентов в растворе, оптимальной для лизиса клеток

Дезоксихолат натрия, %	3	2	2	0,5	0,25	0,2	0
Твин 80, %	0	0,75	0,5	0,25	0,2	0,1	0,2
Снижение вязкости	–	+	+	+	+	+	–

Окончательно препараты адренодоксина очищали с помощью ионообменной хроматографии на колонке Mono Q, FF в условиях возрастающего градиента концентрации KCl от 0,2M до 1,0M. В результате очистки препараты рекомбинантного адренодоксина были получены с индексом A_{414}/A_{276} , равным 0,92, что соответствует степени очистки адренодоксина по стандартной методике [1]. Количество адренодоксина определяли, используя коэффициент молярной экстинкции 10 mM⁻¹ для максимума поглощения при 414 нм.

Ферментативную активность двух препаратов His-Tag фьюжен адренодоксина определяли по скорости восстановления 100 мкМ цитохрома *c* в 30 mM калий фосфатном буфере. pH 7.4. Реакцию инициировали добавлением NADPH до конечной концентрации 100 mM. Восстановление цитохрома *c* измеряли по величине поглощения при 550 нм, а активность рассчитывали с использованием коэффициента экстинкции, равного для восстановленного цитохрома *c* 20 mM⁻¹ см⁻¹.

Результаты и обсуждение

Адренодоксин, электрон-транспортный белок, содержащий в качестве простатической группы железосеросодержащий кластер. Адренодоксин осуществляет перенос электронов от адренодоксин редуктазы к цитохрому P-450 в процессе биосинтеза стероидных гормонов. Возможность биосинтеза стероидных биорегуляторов *in vitro* привело к необходимости наработки и очистки рекомбинантных белков, компонентом стероидгидроксилирующих систем. Введение в адренодоксин His-Tag последовательности могло значительно ускорить и повысить эффективность очистки необходимого белка.

Для конструкции вектора, дающего цитоплазматическую экспрессию рекомбинантного адренодоксина с His-Tag на C-конце, был выбран коммерческий вектор pET-28b(+), резистентный к капамицину и содержащий в полилинкере нужные сайты рестрикции, Hind III и Nco I. Амплификация кДНК адренодоксина была проведена ПЦР, с соответствующими праймерами. Последовательность C-концевых 6 аминокислот белка была заменена последовательностью 6 гистидинов с целью сохранения длины полипептидной цепи адренодоксина. Продукт ПЦР подвергался обработке рестриктазами Hind III и Nco I, вносимыми в реакционную смесь как в различной последовательности, так и одновременно, но лигирование рестрикта с линеализованным вектором pET-28b(+) не давало положительного результата. Невозможность получения липких концов у кДНК адренодоксина, вызванное, по-видимому, недостаточной длиной последовательности нуклеотидов в гене, привело к необходимости проведения A-тайлинга продукта ПЦР с использованием pGEM-T Easy вектора для лигирования модифицированного рестрикта. Селекция положительных клонов трансформированных JM 109 клеток была проведена с помощью скрининга белых, исключая отрицательные голубые колонии, после индукции IPTG, высеянных на агарозу клеток в LB-среде, содержащей X-Gal. Обработка амплифицированного вектора, pGEM-T-Adx, рестриктазами Hind III и Nco I позволила выделить кДНК адренодоксина, способную к лигированию с линеализованным теми же рестриктазами pET-28b(+) вектором.

Трансформация вектора, содержащего кДНК адренодоксина, была проведена в высоко амплифицируемый штамм *E. coli* клеток, BL21(DE3). Процедура экспрессия His-Tag фьюжен адренодоксина не отличалась от стандартной, а выделение и очистка белка состояли из двух стадий: лизиса клеток и металл-хелатной хроматографии. После этих стадий степень очистки адренодоксина составляла приблизительно 85–90%. Ионообменная хроматография на MonoQ FF колонке в градиенте концентрации KCl позволила получить гомогенный препарат. По сравнению с традиционной схемой очистки рекомбинантного адренодоксина, включающей четыре стадии: два сульфат аммонийного фракционирования, гидрофобную хроматографию на Butyl-Sepharose и ионообменную хроматографию — процесс очистки фьюжен His-Tag адренодоксина был значительно короче и по количеству стадий (всего 2), и по времени их проведения, но не уступал по эффективности. Ферментативная активность обоих препаратов белка (с гистидинами на C-конце и без них) в анализе их восстанавливающей способности с цитохромом *c* была одинакова и равнялась 490 мМ⁻¹мин. Единственным недостатком экспрессии адренодоксина в pET-28b(+) векторе было восьмикратное снижение выхода адренодоксина по сравнению с экспрессией белка в тех же бактериальных клетках, трансформированных исходной плазмидой pKKAdx (табл. 2). Одной из причин столь значительного снижения выхода мутированного белка могла быть цитоплазматическая экспрессия адренодоксина, который, по-видимому, чувствителен к цитоплазматическим протеазам. Такое предположение можно было сделать, основываясь на факте, что исходный вектор, pKKAdx, содержал конструктор, ответственный за периплазматическую экспрессию адренодоксина (рис. 1).

Оригинальный вектор, pKKAdx, для экспрессии рекомбинантного адренодоксина был сконструирован так, что секреция вновь синтезируемого полипептида происходила в периплазматическое пространство бактерии, где сигнальный пептид отщеплялся с сохранением N-концевой последовательности экспрессируемого протеина. В периплазме белок в большей степени защищен от действия цитозольных протеаз и поэтому выход реком-

бинантного продукта значительно выше. Следовательно, получение фьюжен His-Tag аденодоксина необходимо было проводить с

сохранением преимуществ оригинальной плазмиды, рККАdx, обеспечивающей периплазматическую экспрессию протеина.

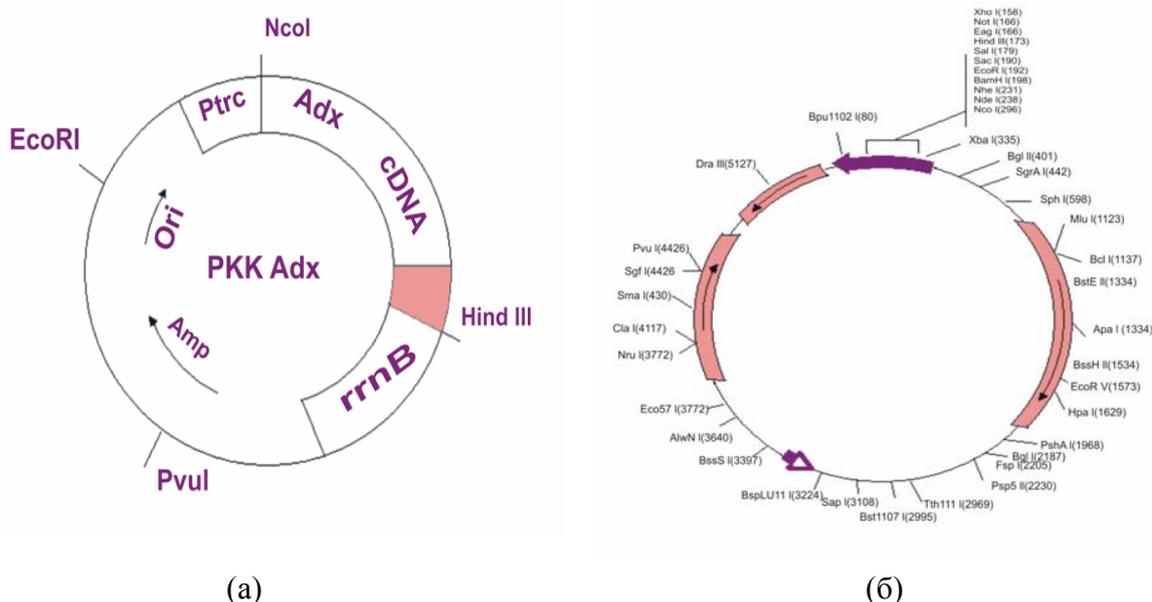


Рис. 1. Конструкция плазмиды рККАdx (а) и коммерческого вектора рЕТ-28b(+) (б).

Технология QCM (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Sistem) позволила за одну стадию провести «кассетный» мутагенез гена аденодоксина, не изолируя его из оригинальной плазмиды рККАdx [2]. Особенностью этого метода является проведение нескольких циклов реакции ПЦР (2–5) с единичными мутагенными праймерами, что позволяет избежать преимущественной димеризации праймеров друг с другом, увеличивая вероятность их взаимодействия с вектором. Вновь синтезированная гибридная плаزمида, содержащая одну исходную цепь нуклеотидов, а другую — вновь синтезированную мутированную, способна более эффективно взаимодействовать с комплементарным мутагенным праймером, тем самым приводя к амплификации модифицированного вектора. DpnI рестриктаза, на 100% гидролизует

исходный метилированный вектор, к сожалению, не всегда расщепляет метилированный аденин, если тот присутствует в плазмиде, поэтому часть ампицилин-резистентного векторного материала не является трансформированным (мутированным), за счет чего эффективность мутагенеза снижается от 65–95%. Выбор положительных клонов осуществляли по дополнительному сортированию резистентных к ампицилину клонов по их рестрикционным картам.

Экспрессия, выделение и очистка His-Tag фьюжен аденодоксина, после мутагенеза вектора рККАdx, были проведены по вышеописанной методике. Количественный анализ очищенного препарата белка показал, что выход аденодоксина с His-Tag на С-конец в условиях периплазматической экспрессии равнялся выходу немутированного рекомбинантного аденодоксина (табл. 2.)

Таблица 2
Количество рекомбинантного аденодоксина, выделяемого при гетерологической его экспрессии в векторе рККАdx и после клонирования

Рекомбинантный немодифицированный аденодоксин (периплазматическая экспрессия)	His-TagС модифицированный аденодоксин в рЕТ векторе (цитоплазматическая экспрессия)	His-TagС модифицированный аденодоксин в рККАdx векторе (периплазматическая экспрессия)
1,0–1,4 мкмоль/литр	120–180 нмоль/литр	1,2–2,0 мкмоль/литр

Еще одной проблемой, с которой часто сталкивается экспериментатор при выделении рекомбинантных белков из бактериальных клеток, является высокая вязкость лизата клеток из-за большого количества геномной ДНК. Одним из способов снижения вязкости раствора лизата является применение ДНКазы I с добавлением в среду детергента. Например, в случае рекомбинантного адренодоксина для повышения растворимости фрагментов ДНК применяли большие концентрации дезоксихолата натрия. Экспериментально нами было установлено, что использование смеси детергентов значительно повышает растворимость фрагментов ДНК, что значительно снижает вязкость лизатов и увеличивает степень деградации нуклеиновой кислоты. Следует отметить, что смесь лизоцима с ДНКазой I в растворе 0,2% дезоксихолата натрия и 0,1% Tween 80 в лизис-буфере особенно полезна при поиске высокопродуктивных клонов, проводимом с помощью электрофореза белков в ПААГ.

Выводы

Применение технологии QCM на векторе рККАdx, ответственного за эндоплазматическую экспрессию белка, и смеси детергентов при лизисе бактериальных клеток позволили получить гомогенный препарат рекомбинантного His-Tag фьюжен адренодоксин с высоким выходом. Анализ ферментативной активности выделенного адренодоксина с His-Tag на С-конце и способности его к белок-белковому взаимо-

действию с адренодоксин редуктазой и цитохромом P-450 scc показал, что выделенный препарат не уступает по этим параметрам рекомбинантному белку, полученному традиционным методом, и может успешно использоваться для биосинтеза препаратов стероидных гормонов.

Заключение

Использование технологии QCM является высокоэффективным методом направленного «кассетного» мутагенеза, который позволяет за одну стадию модифицировать ген, не изолируя его из оригинального вектора. Для получения рекомбинантных белков, отличающихся высокой чувствительностью к протеолитическому расщеплению, следует использовать векторы, обеспечивающие секрецию вновь синтезируемого полипептида в периплазматическое пространство бактерии. Применение различных видов Tag, имеющих аффинность к специфическим матрицам, и смеси детергентов в процессе лизиса бактериальных клеток значительно сокращает время очистки белка и повышает его выход.

ЛИТЕРАТУРА

1. Uhlmann H., Beckert V., Schwarz D. and Bernhardt R. Expression of bovine adrenodoxin in *E. coli* and site-directed mutagenesis of [2Fe-2S] cluster ligands, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1992. — Vol. 188. — P. 1131–1138.
2. Wang W. and Malcolm B.A. Two-Stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Direction Mutagenesis // *BioTechniques.* — 1999. — Vol. 26. — № 4. — P. 680–682.

Поступила 02.12.2005