

Разработка новой химерной белковой конструкции для гидролиза бета-галактозидов

Д. В. ГРИШИН

Московский государственный университет инженерной экологии Федерального агентства по образованию РФ, Москва

Design of a Novel Chimeric Protein Construction for Hydrolysis of Beta-Galactosides

D. V. GRISHIN

Moscow State University of Engineering Ecology, Moscow

Известно, что недостаточность фермента β -галактозидазы (лактазы), расщепляющей лактозу молока имеет особое значение в раннем детстве, так как дисахарид лактоза, содержащийся в молоке, является основным источником галактозы, которая в свою очередь участвует в синтезе галактоцереброзидов, необходимых для нормального развития ЦНС и сетчатки глаза, вследствие чего уменьшение количества лактозы и производных её гидролиза нежелательно, особенно в детском возрасте. Между тем 15–20% населения Земли стабильно подвержено синдрому мальабсорбции (СМА), который выражается, в частности, в лактозонепереносимости и сопряженных с этим явлением последствиях [1].

Наиболее радикальным и эффективным способом лечения СМА, является приём ферментных препаратов, расщепляющих лактозу, которые назначаются вместе с молоком и молочными продуктами (мезофильная β -галактозидаза), однако, в таком случае, наблюдается инактивация фермента и его выведение, вследствие физиологической перистальтики желудочно-кишечного тракта. Принципиально новым подходом к получению препаратов β -галактозидаз с улучшенными характеристиками является внедрение методов генной инженерии. С использованием этих методов возможно создание β -галактозидаз, обладающих повышенной термостабильностью и способностью к самостоятельному аффинному связыванию с биологически совместимыми субстратами (декстран), что значительно облегчало бы процесс очистки фермента. Создание подобных ферментных препаратов становится возможным при использовании штаммов бактерий, трансформированных плазмидной ДНК, несущей ген β -галактозидазы с улучшенными свойствами. В настоящее время описан и получен рекомбинантный белок, обладающий активностью термостабильной β -галактозидазы [2]. А также получен штамм *E.coli*, экспрессирующий данный белок, однако данный

фермент может быть иммобилизован только химическими методами, что способно привести к его значительной инактивации.

В настоящее время во Всемирном генетическом банке аннотированы последовательности декстрансвязывающих доменов, которые в виде индивидуальных белков способны к высокоаффинному связыванию с соответствующими субстратами ($K_d = 10^{-9}$) [3, 4].

Распространённая на сегодняшний день концепция разработки слитных генно-инженерных конструкций [5], позволила нам предложить стратегию получения химерного белка, обладающего одновременно двумя важными свойствами: лактазной активностью и способностью к самостоятельному аффинному связыванию с декстраном.

Целью данной работы явилось создание рекомбинантной плазмидной ДНК, обеспечивающей экспрессию белка ДСД-сп- β -ГАЛ, содержащего термостабильную бета-галактозидазу из термофильного микроорганизма *Thermoanaerobacter ethanolicus* (β -ГАЛ) и декстрансвязывающий домен из *Leuconostoc mesenteroides* (ДСД) в клетках *E.coli*. Кроме того, целью настоящей работы явилось получение штамма-продуцента *E.coli*, а также изучение физических свойств и ферментативной активности белка ДСД-сп- β -ГАЛ в лизатах клеток.

Материал и методы

Бактериальные штаммы и питательные среды, составы буферов, плазмидные векторы, олигонуклеотиды, используемые в работе. Штамм *DH5 α* : *E.coli* [$F^- \phi 80 \text{dlacZ} \Delta M15 \Delta (\text{lacZYA-argF}^-) \text{U169 deoR, recA1 endA1 hsdR17 (r}_k^- \text{nal}^t \text{m}_k^+ \text{phoA supE44} \lambda^- \text{thi-1) gyrA96 relA1}$]. Источник штамма: Zymo Research Corporation (США). Чашка: среда LB+налидиксовая кислота (50 мг/мл)

Жидкая культура: LB + налидиксовая кислота (50 мг/мл).

Штамм *M15*: *E.coli* K12 [$\text{nal}^s \text{str}^s \text{rif}^s \text{lac}^- \text{ara}^- \text{gal}^- \text{mtl}^- \text{F}'\text{-recA}^+, \text{uvr}^+ \text{lon}^+, \text{pREP4} - \text{kanamycin resistance 25 мг/мл}$]. Источник штамма: Qiagen (США). Чашка: LB + канамицин (25 мг/мл). Жидкая культура: среда LB + канамицин (25 мг/мл), pREP4 — экспрессия lac-репрессора.

Питательная среда LB (Luria Broth): 10 г/л пептон; 5 г/л дрожжевой экстракт; 10 г/л NaCl; pH 7,2, среда LB с ампициллином: LB-Medium + 100 мг/мл ампициллина. Среда LB для

© Коллектив авторов, 2009

Адрес для корреспонденции: 117105 Москва, Нагатинская ул., д. 3а. Редакция журнала «Антибиотики и химиотерапия»

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ, 2009, 54; 5–6

3

селекции: LB-Medium + 100 мг/мл ампициллин + 40 мг/мл X-Gal + 0,2 мМ IPTG + 2,5 % агар.

Коммерческие плазмидные векторы: плаزمида pQE-6 QIAGEN (США).

Используемые буферные системы: 50 × ТАЕ (2,0 М трис-НCl; 50 мМ EDTA; 1,0 М уксусная кислота (ледяная), pH 8,8); 5 × DNA-буфер (250 мМ трис-НCl; 0,2 % Bromphenolblau; 40 % глицерол, pH 7,5); TBS (трис буфер Saline); 5 × SDS-PAGE-буфер (250 мМ трис-НCl; 10 мМ EDTA; 5 % (w/v) SDS; 0,005 % β-меркаптоэтанол; pH 6,8); буфер (10 мМ трис-НCl, pH 7,4–9,0; KCl 50 мМ; EDTA 1 мМ; 0,5% (v/v) твин 20; 0,2% (v/v) Тритон X100).

Олигонуклеотиды были синтезированы твёрдофазным амидофосфитным методом с помощью синтезатора АСМ-100-2 (Новосибирск) и очищены методом электрофореза в 12% ПААГ (ЗАО «СИНТОЛ»; ЗАО «Евроген»).

Результаты исследования

Получение и клонирование гена ДСД из *Leuconostoc mesenteroides*. Копия гена декстрансвязывающего домена (ДСД) была получена благодаря ПЦР, с помощью прямого и обратного праймеров (сайты рестриктаз подчёркнуты), фланкирующих генную последовательность ДСД, при этом в качестве ДНК матрицы использовалась хромосомная ДНК *Leuconostoc mesenteroides*.

Праймеры:

GBD11F CCACCGCCATGGATGGGATCCAATCAGTATTAT
 NcoI BamHI
 СААТТАГСАГАТGGТААА

RevGBD АГАСТААГАТCTGGCTGACACAGCATTTCATT
 BglII
 АТТАТСААА

ПЦР проводили на приборе Терцик (ДНК — технология, Россия). Реакцию проводят в 25 мкл реакционной смеси, которая содержала 2,5 мкл Taq pol PCR buffer 10× (СибЭнзим), дНТФ в конечной концентрации 400 мкМ, 4×10^{-7} М каждого праймера, 1 мкл Taq полимеразы (СибЭнзим) 5 ед. активности на реакционный объём, в качестве ДНК матрицы использовалась хромосомная ДНК *Leuconostoc mesenteroides*. На реакционную смесь наслаивали 40 мкл вазелинового масла.

Параметры амплификации заключались в тридцатициклическом чередовании раундов денатурации, отжига праймеров и элонгации дочерних цепей [5]:

95°C — 5 мин; (94°C — 5 с, 60°C — 30 с, 72°C — 40 с) × 30; 72°C — 5 мин; 10°C — хранение. Режим программирования амплификации — точный.

Продукт амплификации размером 416 п. н. обрабатывали хлороформом, переосаждали этанолом и ресуспендировали в буфере трис-НCl 0,05 мМ, pH 7,5. Для дальнейшего клонирования ПЦР-продукт встраивался в коммерческий вектор pQE6 (Quageen, США), методом лигирования полученных рестрикционных

фрагментов по сайтам рестрикции NcoI, BglII/BamHI. Лигирование проводилось посредством ДНК-лигазы фага Т4 при 4°C в соответствующем буфере, в течение 24 часов. Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* М15, которые затем отбирали на агаризованной среде LB с антибиотиками (ампициллин, канамицин). Затем плазмидная ДНК (pQEDBD) выделялась методом щелочного лизиса [6], проверялась методом рестрикционного анализа и секвенирования на автоматическом секвенаторе.

Получение экспрессионной плазмиды pQEDBDsp с геном ДСД из *Leuconostoc mesenteroides* со спейсером на С-конце. Создание гена ДСД-(Gly-Ser)₅, кодирующего белок ДСД и глицин-сериновый спейсер (Gly-Ser)₅, необходимый в дальнейшем для пространственного разделения различных функциональных доменов, осуществлялось в два этапа методом «праймеропосредованной прогулки», при этом происходило постепенное наращивание С-концевой спейсерной последовательности для чего были спланированы следующие праймеры.

GBD11F CCACCGCCATGGATGGGATCCAATCAGTATTATCA
 NcoI BamHI
 АТТАГСАГАТGGТААА

Rev_{DBD-1}: 5'-GGAGCCAGAACCCGGGGATCTTGCTGACAC-3'

Rev_{DBD-2}: 5'-AACTAAGCTTAGATCTGGCGCCAGAACCGGAAC
 HindIII BglII
 САГАСССGGAGCCААСС-3'

На первом этапе «праймер-опосредованной прогулки» использовались праймеры GBD11F и Rev_{DBD-1}, на втором — GBD11F и Rev_{DBD-2}, при этом, последний из праймеров спланирован внахлест с Rev_{DBD-1}. Как видно для дальнейшего клонирования ПЦР фрагмента ДСД-(Gly-Ser)₅ в бактериальный вектор pQE6 (Quageen, USA) в праймерах были спланированы сайты эндонуклеаз рестрикции NcoI, BamHI, BglII и HindIII (отмечены на праймерах подчёркиванием). В качестве матрицы для проведения ПЦР использовали плазмидную ДНК, полученную на предыдущем этапе pQEDBD. Амплификация проводилась в автоматическом режиме на приборе Терцик (Россия) при следующих условиях:

95°C — 5 мин; (94°C — 10 с, 60°C — 30 с, 72°C — 40 с) × 30; 72°C — 5 мин; 10°C — хранение. Режим программирования амплификации — точный.

Далее, по сайтам рестрикции NcoI и HindIII скорректированный ген ДСД, обладающий С-концевым спейсером был интегрирован в бактериальный вектор pQE6 (Quageen, США), при этом была получена экспрессионная плазмиды pQEDBDsp.

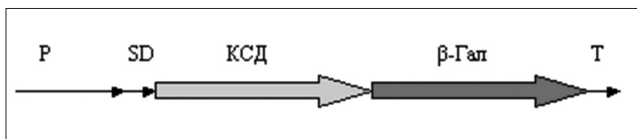


Рис. 1. Общая схема организации химерных генно-инженерных конструкций.

Р – промотор; SD – сайт Шайна-Дальгарно; КСД, β-Гал – последовательности ДНК, кодирующие карбогидратсвязывающий домен и β-галактозидазу соответственно; Т – терминирующий кодон.

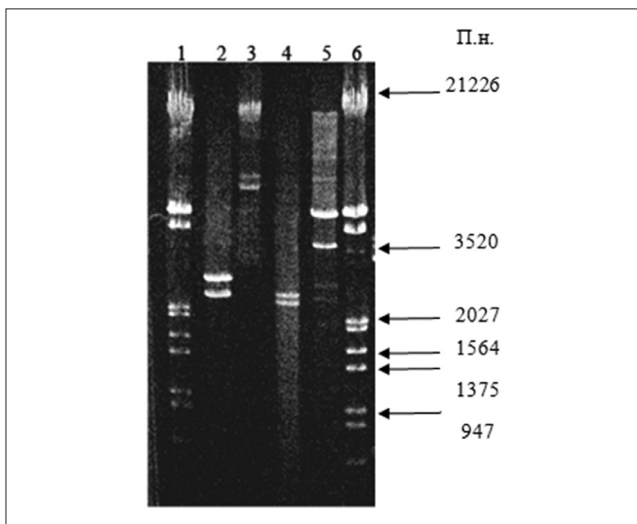


Рис. 2. Электрофорез длины рестрикционных фрагментов в 1% агарозном геле.

- 1) Маркер мол. массы (фаг лямбда EcoRI/HindIII);
- 2) pGD-10 (EcoRI/BglII, рестрикц. фрагменты 2706/2405 п. н.);
- 3) pGD-10, не рестрицированная;
- 4) pQELacZTm, (EcoRI/BglII, рестрикц. фрагменты 2405/2286 п. н.);
- 5) pQELacZTm, не рестрицированная;
- 6) Маркер мол. массы (фаг лямбда EcoRI/HindIII).

Получение экспрессионной плазмиды pGD-10 с геном химерного белка ДСД-сп-β-ГАЛ. Плазмидная конструкция pGD-10 с геном химерного белка ДСД-сп-β-ГАЛ (рис. 1) была собрана посредством лигирования ранее полученных экспрессионных плазмид pQEDBDsp (с геном ДСД из *Leuconostoc mesenteroides* со спейсером на С-конце) и pQELacZTm (pR624) (с геном термостабильной бета-галактозидазы из термофильного микроорганизма *Thermoanaerobacter ethanolicus*, любезно предоставлена к. х. н. Сергиенко О. В.) по рестрикционным сайтам BglII/BglI и BamHI/BglI соответственно.

Трансформацию и молекулярное субклонирование в *E.coli* DH5a проводили по стандартным методикам [6]. Выделение плазмидной ДНК осуществляли посредством метода щелочного лизиса. Доказательство введения рекомбинантных ДНК в бактерии осуществлялось на

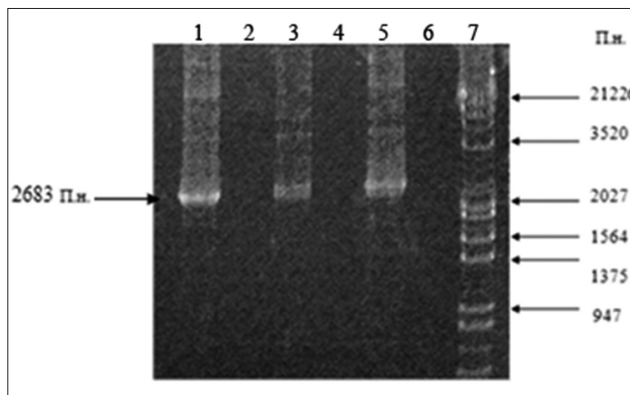


Рис. 3. Электрофорез ПЦР продуктов в 1% агарозном геле.

- 1) ПЦР продукт гена белка ДСД-сп-β-ГАЛ, проба № 1 (2683 п. н.);
- 2) Отрицательный контроль (pQE6, Taq полимеразы);
- 3) ПЦР продукт гена белка ДСД-сп-β-ГАЛ, проба № 2 (2683 п. н.);
- 4) Отрицательный контроль (pQE6, Taq полимеразы);
- 5) ПЦР продукт гена белка ДСД-сп-β-ГАЛ, проба № 3 (2683 п. н.);
- 6) Отрицательный контроль (pQE6, Taq полимеразы);
- 7) Маркер мол. массы (фаг лямбда EcoRI/HindIII).

основе анализа выделенных плазмид с помощью рестрикционного скрининга, при этом наблюдался сдвиг полос на ожидаемую величину относительно контроля (трек 4) (рис. 2). Идентичность клонированного в составе вектора pGD-10 гена ДСД-сп-β-ГАЛ (размер гена 2683 п. н.) была подтверждена с помощью полимеразно-цепной реакции (ПЦР), посредством прямого (GBD11F) и обратного праймеров (Revgal), фланкирующих целевую генную последовательность:

GBD11F 5'-CCACCGCCATGGATGGGATCCAATCAGTATTATCAATTAGCAGATGGTAAA-3'

Revgal: 5'-GAGAAGACGAAAGGGCCTATAACGCCTATTTTATAGGTTAAAATG-3'

Параметры амплификации:

95°C – 5 мин; 94°C – 20 с, 60°C – 30 с, 72°C – 2,5 мин) × 30; 72°C – 5 мин; 10°C – хранение. Режим программирования амплификации – точный. Продукты амплификации детектировались в 1% агарозном геле (рис. 3).

В итоге была проклонирована, а также методами ПЦР и анализа длины рестрикционных фрагментов секвенирована нуклеотидная последовательность гена белка ДСД-сп-β-ГАЛ.

Получение бактериального штамма – продуцента, обеспечивающего экспрессию белковой конструкции ДСД-сп-β-ГАЛ в цитоплазме клеток *E.coli*. Данный этап работы заключался в трансформации клеток *E.coli* DH5a полученной плазмидной ДНК pGD-10. Выбранный по результа-

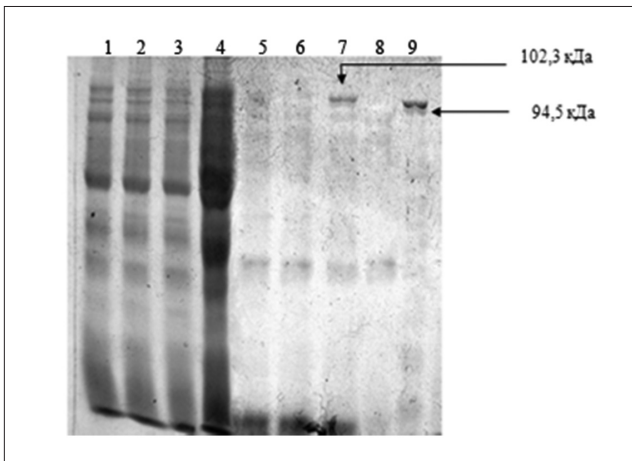


Рис. 4. Электрофорез в 10% ПААГ в присутствии SDS.

- 1) Штамм DH5a – до индукции,
- 2) Штамм DH5a [pGD10] – до индукции,
- 3) Штамм DH5a – индукция,
- 4) Штамм DH5a [pGD10] – индукция,
- 5) Штамм DH5a до индукции; термолиз (75°C),
- 6) Штамм DH5a [pGD10] – до индукции; термолиз (75°C),
- 7) Штамм DH5a [pGD10] – индукция; термолиз (75°C),
- 8) Штамм DH5a – индукция; термолиз (75°C),
- 9) Маркер мол. массы (Тақ полимераза, 94,5кДа).

там секвенирования продуцент *E. coli* DH5a [pGD-10] выращивали на агаризованной среде LB, содержащей антибиотика ампициллин и налидиксовую кислоту для селекции; синтез белка индуцировали добавлением изопропил- β -D-тиогактопиранозид (ИПТГ) в конечной концентрации 0,3 мМ, при достижении оптической плотности OD=0,9. Время индукции составляло 4,0 ч. Клеточные осадки подвергали ультразвуковой дезинтеграции, термолизу (75°C), после чего клеточный дебрис осаждали центрифугированием и собирали супернатант (растворимая фракция белка). Уровень экспрессии целевого белка с молекулярной массой 102,3 кДа составлял порядка 15% от общего клеточного белка, что продемонстрировано на электрофорезе в 10% полиакриламидном геле относительно соответствующих контролей (рис. 4), в присутствии додецилсульфата натрия (SDS). При этом, параллельно, посредством термолиза была доказана растворимость полученного белка (присутствие в супернатанте) и его термостабильность, что принципиально важно в тех случаях, когда необходимо избавиться от фоновой активности мезофильной бета-галактозидазы.

Изучение бета-галактозидазной активности целевого белка в клеточных лизатах. Для изучения бета-галактозидазной активности химерной белковой конструкции ДСД-сп- β -ГАЛ в лизатах DH5a (lacZ-), клетки с экспрессионной плазмидой pGD-10 выращивали в 4 мл среды LB до достижения оптической плотности 0,4–0,9

при $\lambda=600$ нм, затем пробу индуцировали добавлением 4 мкл 0,3М ИПТГ, при этом время индукции составило 4 ч. Затем, отбирали 500 мкл индуцированной культуры, осаждали 10 мин при 6000 об/мин и ресуспендировали в 500 мкл рабочего буфера, содержащего 50 мМ трис-HCl; 10мМ CaCl₂, 10мМ MnCl₂; 0,1 мМ β -меркаптоэтанол при pH=7,4. После этого пробу лизировали ультразвуком, либо чередованием замораживания и оттаивания проб при -20°C, после чего избавлялись от клеточного дебриса центрифугированием в течение 10 мин при 13000 об/мин.

Далее в супернатанте лизатов клеток определяли собственно бета-галактозидазная активность белка ДСД-сп- β -ГАЛ по способности гидролизовать хромогенный аналог лактозы — ОНФГ (орто-нитро-фенил- β -D-галактопиранозид) с образованием галактозы и окрашенного в желтый цвет соединения 2-нитрофенола. С этой целью к 0,1 мл осветленного лизата добавляли 0,7 мл рабочего буфера и 0,2 мл ОНФГ (4 мг/мл), после чего реакционную смесь инкубировали 10–15 мин при оптимальной для белков подобного класса температуре 65°C. Останавливалась реакция добавлением раствора 1М карбоната натрия.

За единицу активности принимали количество 2-нитрофенола, образующегося за 1 мин. Концентрацию 2-нитрофенола рассчитывали спектрофотометрически при $\lambda=420$ нм. Расчёты производились по модифицированной формуле Миллера (1):

$$(1) \alpha = D_{420} / \tau v D_{600},$$

где: α — активность фермента (ед/мкл), D_{420} — измеренное значение плотности для реакционной смеси, D_{600} — оптическая плотность клеточной суспензии перед определением, τ — время реакции, мин, v — объём культуры, взятой для определения, мл [7].

В ходе расчётов было определено, что ферментативная активность нашего белка в лизатах клеток составила порядка 5 ед/мкл при 65°C и pH 7,4.

Выводы

1. Проведено планирование и в составе экспрессионной плазмиды pGD10 клонирование гена химерного белка ДСД-сп- β -ГАЛ.
2. Определена термостабильность и растворимость рекомбинантного белка ДСД-сп- β -ГАЛ в лизатах клеток *E. coli* DH5a.
3. Продемонстрирована ферментативная бета-галактозидазная активность целевого белка в лизатах клеток *E. coli* DH5a.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ладодо К. С.* Руководство по лечебному питанию детей, М.: 2000; 384.
2. United States Patent. Pub№.: UniProt №Y08557, Pub.Date: December 15, 1998.
3. *Morisaki H., Igarashi T., Yamamoto A., Goto N.* Department of Oral Microbiology, Showa University School of Dentistry, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan, Letters in Applied Microbiology 2002; 35: 223—227.
4. *Hashimoto M., Ikegami T., Seino Sh. et al.* Department of Biosystem Science, Kyoto, Japan, J Bacteriology 2000; 11: 3045—3054.
5. *Глик Б., Пастернак Дж.* Молекулярная биотехнология (принципы и применение). М.: 2002; 158—330.
6. *Маниатис Т. и др.* Молекулярное клонирование: учебник. М.: 1984; 450.
7. *Миллер Д.* Эксперименты в молекулярной генетике / Под редакцией Алиханяна С. И. М.: 1976; 324—327.