

УДК 577.152.2

НОВЫЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКООЧИЩЕННОГО БЕЛКА Р32 БАКТЕРИОФАГА Т4 ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Н.В. Зырина^{1*}, Л.А. Железная¹, И.В. Свадьбина¹, Н.И. Матвиенко²

1 Учреждение Российской академии наук Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290 г. Пущино Московской обл., ул. Институтская, 3, тел. (495) 632-78-69. E-mail: office@iteb.ru

2 Учреждение Российской академии наук Институт белка РАН, 142290, г. Пущино Московской обл. Институтская, 4, тел. (495) 514-02-18, E-mail: protres@vega.protres.ru

Резюме:

В настоящее время для биомедицинских исследований широко используются различные методы амплификации нуклеиновых кислот. Однако при амплификации ДНК часто возникает проблема появления неспецифических продуктов. Применение в реакциях амплификации ДНК белков, связывающихся с оцДНК (белков SSB - single-stranded DNA binding) бактериофага Т4 и *E.coli*, часто приводит к решению этой проблемы. В связи с этим актуальной является задача получения высокоочищенных препаратов SSB белков, свободных от примесей ДНК и нуклеаз. Мы разработали новый метод получения высокоочищенного белка SSB (Т4gp32) из сконструированного нами штамма-суперпродуцента. Особенностью разработанного нами метода выделения белка Т4gp32 является обработка клеточного лизата спермином для освобождения препарата от примесей нуклеиновых кислот и применение на последующих этапах очистки белка хроматографией на гепарин-сефарозе, что позволило получить препарат с чистотой более 99% свободный от экзо-и эндонуклеазных активностей.

Ключевые слова: неспецифическая амплификация ДНК, выделение рекомбинантного белка Т4gp32

**A NEW METHOD FOR PREPARATION OF HIGHLY PURIFIED THE
BACTERIOPHAGE T4 GENE 32 PROTEIN FOR BIOMEDICAL RESEARCH**

N.V. Zyrina^{1*}, L.A. Zheleznaya¹, I.V. Svadbina¹, N.I. Matvienko²

Russian Academy of Sciences Institute of Theoretical and Experimental Biophysics

Russian Academy of Sciences Institute of Protein Sciences

Abstract:

Many recent advances in biomedical research can be attributed to a variety of DNA amplification methods. However the most significant problem is the appearance of nonspecifically amplified products. Employing single-stranded DNA binding (SSB) proteins from *E.coli* and bacteriophage T4 for DNA amplification often eliminates this problem. Thereby techniques for DNA amplification in biomedical research require the use of highly purified preparations of SSB proteins, free of DNA and nucleases. We suggest a new method for preparation of highly purified recombinant bacteriophage T4 gene 32 protein (T4gp32). Removal of nucleic acids was obtained by treatment cell lysate with spermine. Subsequent purification T4gp32 by chromatography on heparin-sepharose column allowed obtaining nuclease-free preparation better than 99% homogeneity.

Key words: nonspecific DNA amplification products, purification of recombinant protein T4gp32

* Адресат для корреспонденции и запроса оттисков: E-mail: zyrina.nv@gmail.com

* Corresponding author. E-mail: zyrina.nv@gmail.com

Введение

В настоящее время для биомедицинских исследований, помимо широко используемой ПЦР, активно разрабатываются различные методы амплификации нуклеиновых кислот [1-4]. Однако при амплификации ДНК часто возникает проблема появления неспецифических продуктов, особенно, если в реакции используется сложная матрица (геномная ДНК или ДНК, способная формировать вторичные структуры) и/или очень низкое количество матричной ДНК [5, 6]. Показано, что применение в реакциях

амплификации ДНК белков SSB бактериофага Т4 (Т4gp32) и *E.coli*, наряду с повышением эффективности амплификации приводит к устранению неспецифических продуктов [6-9].

Целью настоящей работы была разработка нового метода получения высокоочищенного белка SSB Т4gp32 для применения его в биомедицинских исследованиях ДНК. Дело в том, что для применения в этой области препарат белка должен быть не только высокоочищенным, но и свободным от примесей нуклеиновых кислот. Обычно для освобождения от примесей ДНК в препарате белка Т4gp32 при его выделении используется метод, основанный на обработке клеточного экстракта панкреатической ДНКазой с последующим выделением белка на колонке с иммобилизованной одноцепочечной ДНК [10]. Однако использование ДНКазы для очистки ДНК-связывающего белка влечет за собой ряд проблем, касающихся увеличения стоимости при масштабном выделении белка и применения препарата в медицине. Во-первых, требуется многостадийная очистка белка от примесей использованной ДНКазы [11]. Во-вторых, коммерческие препараты панкреатической ДНКазы могут содержать примеси химотрипсиногена В, который при гидролизе конвертирует в химотрипсин [12]. Химотрипсин расщепляет Т4gp32 с образованием более низкомолекулярного продукта Р32* (или Р27) с молекулярной массой 27 кДа. Этот продукт, в отличие от исходного Т4gp32, способен расплетать двуспиральную ДНК [13]. При хранении при 4°С препаратов Т4gp32, полученных с использованием коммерческих препаратов ДНКазы, большая часть Т4gp32 может конвертировать в Р27 [14].

Применение для освобождения от ДНК клеточных лизатов широко распространенных безДНКазных методов (использование полиэтиленгликоля и полиэтиленимина), приводят к значительным потерям выделяемого белка [15].

Мы предлагаем новый метод получения высокоочищенного белка Т4gp32. Ген белка был клонирован нами в экспрессионный вектор рЕТ28b(+) и индуцирован в штамме *E. coli* Top10. Белок Т4gp32 был очищен из экстракта клеток *E. coli* Top10, содержащих рекомбинантную плазмиду рЕТ28b/gp32, по разработанной нами схеме без использования ДНКазы I.. Для осаждения из клеточного лизата нуклеиновых кислот мы использовали спермин (N-(3-аминопропил)-1,4-диаминобутан)) – низкомолекулярный поликатионный реагент. Было показано [15], что добавление этого недорогого синтетического реагента в клеточные лизаты значительно уменьшало содержание в них геномной и плазмидной ДНК без значительной потери выделяемого белка, по сравнению с другими безДНКазными методами освобождения от нуклеиновых кислот. Для полной очистки

белка от остатков низкомолекулярных нуклеиновых кислот проводили хроматографию на колонке с ДЭАЭ-сефацелом [16]. Последующие стадии хроматографии на колонках с гепарин-сефарозой и фенил-сефарозой позволили получить электрофоретически гомогенный и активный белок T4gp32, свободный от примесей ДНК и детектируемых нуклеазных активностей. Активность проверяли по замедлению подвижности одноцепочечной ДНК (оцДНК) фага M13 при связывании с белком T4gp32 в агарозном геле на электрофорезе, а также по способности ренатурировать денатурированную ДНК фага T4.

Материалы и методы

Фаги, плазмиды, штаммы. Мутант фага T4 52⁻ 42⁻ (*denA*, *denB*, *ndd*, *ac*), *alc* получен из коллекции Б. Катер (Evergreen state college, США). Векторная плазида pET28b сконструирована фирмой «Novagen» (США); штамм *E.coli* Top10 получен от фирмы «Invitrogen» (США).

Ферменты. ДНК-полимеразы Taq и Pfu, полинуклеотидкиназа фага T4, ДНК лигаза фага T4, эндонуклеазы рестрикции Bli736I (изошизомер [17] и XhoI выделены в нашей лаборатории. Эндонуклеаза NcoI получена от фирмы «New England Biolabs» (США).

Олигонуклеотиды.

P32 forw: GCG **GGTCTC** GC ATGTTTAAACGTAAATCT

P32 rev: GCC **CTCGAG** TTAAAGGTCATTCAAAAG

Жирным шрифтом в праймерах выделены сайты эндонуклеаз Bli736 и XhoI в последовательностях прямого и обратного праймеров соответственно, тонкой чертой подчеркнуты последовательности гена.

Олигонуклеотиды синтезированы фирмой «Синтол» (Россия).

Клонирование последовательности гена 32 фага T4. Последовательность гена 32 фага T4 амплифицировали в полимеразной цепной реакции с использованием геномной ДНК фага T4 в качестве матрицы и ДНК-полимераз Taq и Pfu в соотношении 7:1. Амплифицированные фрагменты расщепляли эндонуклеазами XhoI и Bli736I, при расщеплении которой образуется выступающий конец, комплементарный выступающему концу, образуемому при расщеплении рестриктазой NcoI. Фрагменты после расщепления были очищены элюцией из агарозного геля и лигированы с плазмидой

pET28b(+), расщепленной по сайтам NcoI и XhoI. Лигазной смесью были трансформированы клетки *E. coli* Top10. Рекомбинантный вектор был верифицирован расщеплением эндонуклеазами рестрикции, секвенированием и в опытах по индукции синтеза белка T4gp32. ПЦР, клонирование, лигирование и трансформацию клеток проводили по стандартным методикам, изложенным в руководстве Маниатиса, и др. [18].

Секвенирование ДНК проводили терминаторным методом на приборе ABI PRISM 310 фирмы «Applied Biosystems» (США).

Выращивание биомассы и индукция белка. Клетки *E. coli* Top10, содержащие рекомбинантную плазмиду, культивировали в двухлитровых колбах, содержащих 200 мл среды LB (10 г триптон, 5 г дрожжевой экстракт, 10 г NaCl на литр среды) с канамицином (50 мкг/мл) при 37°C до OD₅₉₀ равной 0,6-0,8. Затем проводили индукцию экспрессии гена 32, заражая культуру бактериофагом λCE6 с множественностью 5 фаговых частиц на бактериальную клетку. После 3 часов роста клетки быстро охлаждали, собирали центрифугированием в течение 30 мин. при 3000g и хранили при -20°.

Приготовление клеточного экстракта. Замороженную биомассу, полученную из 2-х литров среды (9,13 г), суспендировали на ледяной бане, добавляя 3 мл охлажденного буфера L (40 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1mM ЭДТА; 1mM β-меркаптоэтанол) на 1г биомассы и разрушали, обрабатывая ультразвуком на дезинтеграторе УЗДН-А в течение 18 минут (3-х минутный импульс 3-х минутной паузой). Полноту разрушения клеток оценивали по уменьшению плотности раствора на фотоэлектроколориметре ФЭК-56ПМ при λ=590 нм; 10-кратное падение оптической плотности свидетельствовало о хорошем разрушении клеток. Фрагменты клеток устраняли центрифугированием на Janetzki K-24 (Германия) при 15000 об/мин в течение 40 мин. Для осветления экстракта и осаждения нуклеиновых кислот к супернатанту добавляли по каплям 10%-ный Тритон X-100 до 0,1% и 250 mM спермин до 10 mM, слегка перемешивали, оставляли на 30 мин при 4° и центрифугировали 30 мин при 25000g («Beckman», США) [15].

Все этапы выделения белка проводили при 4°C. Фракции, получаемые в процессе выделения белка, анализировали в 0,1%-ном Ds-Na – 10% ПАА геле с окраской его 0,2%-ным кумасси бриллиантовым голубым G-250 («Serva», Германия)[19].

Хроматография. К обработанному спермином клеточному лизату (35 мл) добавляли NaCl до 0,1 M, после чего наносили на колонку с ДЭАЭ-сефацелом объемом 30 мл, уравновешенную буфером D (0,1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM ЭДТА, 1 mM

β -меркаптоэтанол), и промывали 50 мл того же буфера при скорости 10 мл/ч. Элюцию белков, связавшихся с носителем, проводили линейным градиентом NaCl (0,1 – 0,4 М NaCl) на буфере D со скоростью 20 мл/час. Объем градиента 190 мл. Оптический профиль элюции определяли по поглощению на 280 нм в проточном спектрофотометре.

Фракции (3,2 мл каждая), содержащие белок T4gp32, объединяли и диализовали против буфера H (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM ЭДТА, 1mM β -меркаптоэтанол). Фракции после диализа наносили на колонку с гепарин-сефарозой (30 мл) уравновешенную буфером H. После промывания колонки 50 мл того же буфера белки элюировали линейным градиентом NaCl от 0 до 0,5 М на основе буфера H при скорости 20 мл/ч. Объем градиента 190 мл, объем каждой фракции 5 мл.

В собранные фракции добавляли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}$ до 14% и наносили колонку с фенил-сефарозой (объем 6 мл), уравновешенную буфером PS (0,1 М NaCl, 30 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM β -меркаптоэтанол, 10 mM MgCl_2 ; 14%-ный $(\text{NH}_4)_2\text{SO}$, 10%-ный глицерин (вес/объем)) Колонка была промыта 12 мл буфера PS. Элюцию белка T4gp32 проводили 50 мл обратного линейного градиента от 14% до 0 сульфата аммония на буфере PS. Для полной элюции белка T4gp32 колонку дополнительно промывали буфером PS без сульфата аммония. Скорость потока на колонке с фенил-сефарозой была 15 мл/ч. Фракции объемом 2,5 мл каждая, содержащие очищенный белок T4gp32, диализовали сначала против буфера S1 (0,1 М NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 mM ДТТ, 1mM ЭДТА, 10%-ный глицерин (вес/объем)), а затем против буфера S2 (0,1 М NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 mM дитиотрейтол, 1mM ЭДТА, 50%-ный глицерин (вес/объем)). Препарат хранили при -20° .

Концентрацию белка определяли на спектрофотометре Hitachi 220A (Япония) при длине волны 280 нм из расчета 1 О.Е. равна 0,86 мг/мл белка (значение взято из программы Vector NTI).

Тест на отсутствие экзонуклеазной активности в препарате белка T4gp32.

Реакцию проводили, инкубируя 40 мкг/мл линейной одноцепочечной ДНК (олигонуклеотид, меченый [$\gamma^{32}\text{P}$] АТФ) со 100 мкг/мл белка T4gp32 в буфере, содержащем 0,1 М NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10mM MgCl_2 , 0,5 mM дитиотрейтол, в течение часа при температуре 37°C .

Тест на отсутствие эндонуклеазной активности в препарате белка T4gp32.

Реакцию проводили в 20 мкл буфера MRB (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 10 mM

MgCl₂, 1 mM DTT [18], содержащего 12 мкг/мл кольцевой одноцепочечной ДНК или 4 мкг/мл кольцевой двуспиральной ДНК фага M13 и 200 мкг/мл белка T4gp32.

ДНК связывающую активность белка T4gp32 определяли по замедлению подвижности одноцепочечной ДНК фага M13 при электрофорезе в 1%-ном нативном агарозном геле при связывании ее с белком T4gp32. Для этого 7,5 мкг/мл ДНК фага M13 (одноцепочечная или репликативная формы) выдерживали 20 мин при комнатной температуре с различными количествами белка T4gp32. Реакционная смесь (40 мкл) содержала: 0,1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1mM ЭДТА, 10%-ный глицерин.

Ренатурация ДНК T4 в присутствии белка T4gp32. ДНК бактериофага T4 денатурировали, прогревая ее при 93°C в течение трех минут, после чего раствор зко охлаждали до 4°C. Ренатурацию ДНК оценивали на спектрофотометре Hitachi 220A (длина волны 260 нм) по изменению оптической плотности раствора в присутствии T4gp32 при комнатной температуре. Состав буфера был таким же, как в реакции определения ДНК связывающей активности белка T4gp32.

Результаты и их обсуждение

Получение суперпродуцента белка T4gp32. Первая попытка клонировать ген T4gp32, пердпринятая Кришем и Селзером [20], была безуспешной из-за возможной токсичности большого количества белка T4gp32 для клеток *E. coli*. Получить суперпродуцент этого белка удалось путем сложной схемы сборки фрагментов гена до целого гена под контролем термоиндуцибельного промотора p_L фага лямбда. Эта схема позволила элиминировать участок мРНК в некодирующей 5'-концевой части, ответственный за ауторегуляцию T4gp32 на уровне трансляции [21]. После индукции клеток при 40°C в течение 1 часа выживаемость клеток составляла около 1%, что подтвердило начальные предположения о токсичности белка T4gp32 для клеток *E. coli* при его избытке.

Исходя из данных о возможной токсичности для клетки большого количества белка T4gp32 мы решили использовать для экспрессии T4gp32 один из векторов системы pET, плазмиду pET28b, содержащую поздний промотора фага T7. Выбор этого вектора обусловлен тем, что он несет маркер резистентности к канамицину, а не ампициллину, как большинство экспрессионных векторов. Известно, что рекомбинантные ДНК с маркером Ap^r часто элиминируются из клетки на поздних стадиях роста бактериальной культуры из-

за того, что β -лактамаза секретируется из клеток и расщепляет антибиотик в культуральной среде.

Система векторов рЕТ позволяет производить индукцию гена двумя методами [22]. Первый метод используется наиболее часто и состоит в использовании хозяина, в хромосоме которого находится дефектный профаг λ DE3 с геном РНК-полимеразы фага Т7 под контролем промотора фага p_{lac}. Индукция в этом случае осуществляется добавлением в среду изопропилтиогалактозида в середине логарифмической фазы роста. Такой метод не рекомендуется для экспрессии токсичных белков, поскольку базальный уровень экспрессии РНК-полимеразы фага Т7 обеспечивает некоторый уровень синтеза продукта гена под контролем промотора Т7 на протяжении всего процесса роста культуры, что в случае токсичных белков часто приводит к элиминации плазмиды или селекции вариантов с мутациями в клонированном гене.

Мы выбрали второй метод, в котором ген РНК-полимеразы фага Т7 не присутствует в хозяйском штамме, а доставляется в клетки инфекцией их в середине логарифмической фазы фагом λ CE6, в котором ген РНК-полимеразы находится под контролем промоторов p_L и p_R. Такой метод индукции предпочтительнее для токсичных белков, поскольку в клетках отсутствует РНК-полимераза фага Т7 и, соответственно, отсутствует и синтез даже незначительного количества продукта гена, клонированного под промотор фага Т7.

Следует отметить, что метод индукции экспрессии гена фагом λ CE6 не лишен недостатков. Во-первых, необходимо нарабатывать в большом количестве фаг λ CE6, а коммерческие препараты этого фага дороги. Во-вторых, ген РНК-полимеразы при выращивании фага часто элиминируется и каждый препарат фага должен быть проверен на его способность обеспечивать эффективную индукцию гена с фагово-специфичного промотора. Для этой цели мы сконструировали плазмиду на базе вектора рЕТ21а, в которой ген зеленого флуоресцирующего белка (GFP) находится под контролем промотора фага Т7. Каждый препарат фага проверялся на его способность индуцировать GFP с использованием штамма *E.coli*, содержащего эту плазмиду.

Вектор рЕТ28b имеет в качестве сайта, содержащего иницирующий кодон, сайт рестриктазы NcoI – CCATGG. Однако, при анализе последовательности гена белка SSB T4gp32 (NCBI GenBank accession № AF158101, 906 п.н.) мы обнаружили в ней последовательность сайта эндонуклеазы NcoI. Две прототипных эндонуклеазы BspLU11I

(сайт ACATGT) и BspHI (сайт TCATGA) и их изошизомеры PciI и RcaI дают такие же 5'-выступающие тетрануклеотидные концы, как и NcoI. При введении сайтов для этих эндонуклеаз в праймеры для ПЦР-амплификации гена 32 фага Т4 накладываются ограничения на первый нуклеотид второго кодона гена. В случае NcoI это должен быть G, BspLU11I – T, BspHI – A. Поскольку в соответствии с правилом «N-rule» от второго аминокислотного остатка зависит стабильность белка [23], менять второй кодон нежелательно. В нашем случае использование BspLU11I не привело бы к изменению второго кодона. Однако сам ген 32 содержит сайт BspLU11I, что исключало возможность использования этой эндонуклеазы. Поэтому для клонирования продукта ПЦР мы решили воспользоваться техникой «спрятанного» сайта [24], когда для создания липких концов, гибридизирующихся с концами фрагментов, полученных под действием NcoI, используется эндонуклеаза типа IIS, дающая тетрануклеотидные 5'-выступающие концы. Эта техника не накладывает никаких ограничений на второй кодон. В качестве эндонуклеазы IIS мы использовали открытую нами рестриктазу Bli736I, сайт которой не встречается в гене 32 фага Т4. Последовательность этого сайта была введена в последовательность прямого праймера, использованного при амплификации гена 32 фага Т4. В обратный праймер заложен сайт XhoI:

Вектор pET28b позволяет получать белки с навешенным на N или C конец полигистидиновым хвостом, что в последующем существенно упрощает очистку белка. Поскольку оба конца белка T4gp32 существенны для его функциональной активности, мы не использовали этот прием и ввели в обратный праймер терминирующий кодон.

После трансформации клеток TOP10 рекомбинантной плазмидой, содержащей ген 32 фага Т4 был, один из клонов (pET28b/P32 K5), плазида которого была верифицирована расщеплением эндонуклеазами рестрикции, секвенированием и в опытах по индукции синтеза белка T4gp32, мы использовали для препаративного выделения белка T4gp32.

Выделение белка T4gp32. Рекомбинантный белок T4gp32 был очищен из экстракта клеток *E. coli* Top10, содержащих рекомбинантную плазмиду pET28b/gp32, по схеме, представленной на Рис. 1.

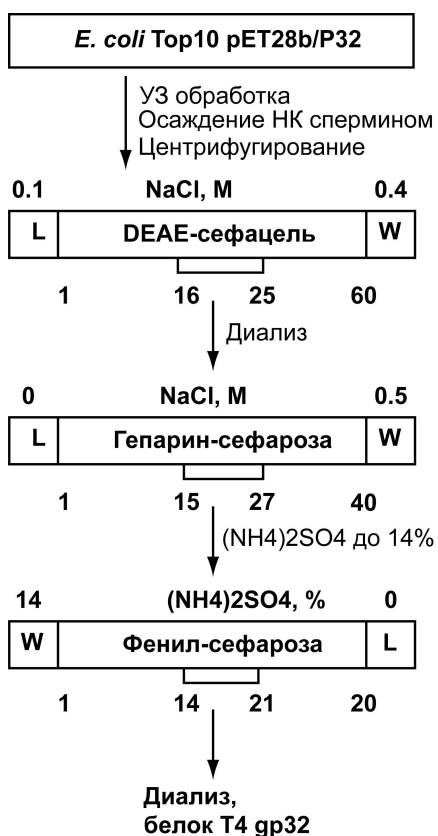


Рис. 1. Общая схема выделения белка T4 gp32.

Прямоугольниками обозначены стадии очистки.

В качестве отдельного этапа выделения белка T4gp32 мы провели осаждение нуклеиновых кислот спермином из лизата клеток перед проведением хроматографии (Рис. 2).

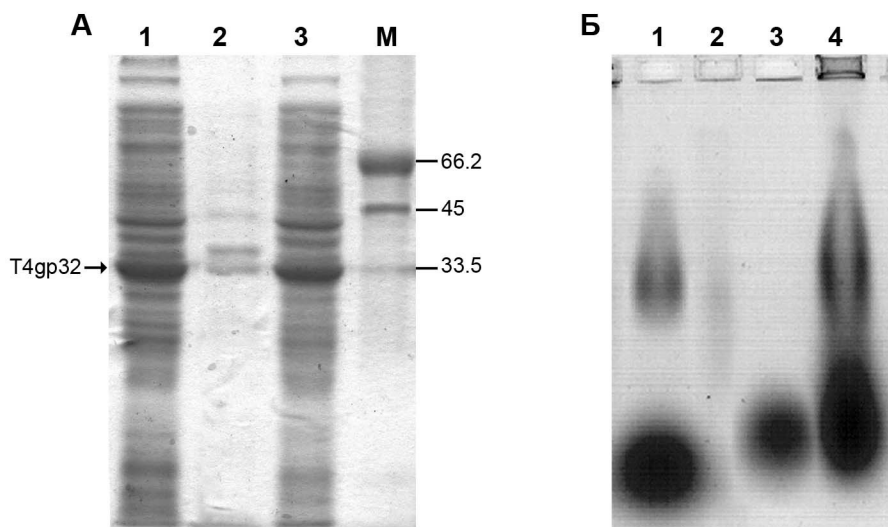


Рис. 2. Осаждение нуклеиновых кислот спермином из клеточного лизата.

(А) Анализ в Ds-Na – 10% ПААГ распределения белков во фракциях после осаждения нуклеиновых кислот спермином. 1 – лизат клеток *E. coli* Top10 pET28b/P32 K5, 2 – осадок после обработки лизата спермином, 3 – супернатант после обработки лизата спермином,

М – маркерные белки БСА (66,2 кДа), овалбумин (45 кДа), белок T4gp32 (33,5 кДа). (Б) Анализ в 1% нативном агарозном геле распределения нуклеиновых кислот во фракциях. 1 – лизат клеток *E. coli* Top10 K5 pET-28b/P32, 2 – осадок после центрифугирования лизата, 3 – супернатант после обработки лизата спермином и 4 – осадок после обработки лизата спермином.

При осаждении спермином нуклеиновых кислот из клеточного лизата ДНК-связывающий белок сохранялся в растворе (Рис. 2А, дорожка 3). Основная часть нуклеиновых кислот оказалась в осадке (Рис. 2Б, дорожка 4). Оставшиеся в супернатанте в незначительном количестве низкомолекулярные нуклеиновые кислоты связывались на следующей стадии очистки белка T4gp32 с ДЭАЭ, и элюировались при концентрации соли около 0,4 М, тогда как белок T4gp32 элюировался раньше (данные не представлены).

Осветленный клеточный лизат после обработки спермином наносили на колонку с ДЭАЭ-сефацелом (Рис. 3).

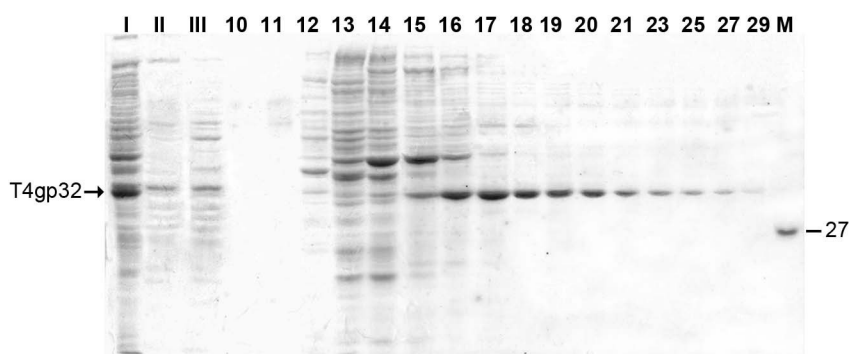


Рис. 3. Анализ фракций, элюированных с ДЭАЭ сефацеля. Электрофорез в Ds-Na – 10% ПААГ. Обозначения фракций: I – супернатант, обработанный спермином, II – белки, не связавшиеся с носителем на стадии нанесения, III – промывка, далее – номера фракций элюции; М – стандартный белок РНКазы III (27 кДа).

Анализ фракций в ПААГ показал, что основное количество клеточных белков находится во фракциях 13 и 14, в то время как белок T4gp32 сосредоточен во фракциях 15 – 23, что соответствует области элюции 0,14 – 0,18 М NaCl. Для нанесения на следующую колонку объединили фракции с 16 по 25, содержащие белок T4gp32 с наименьшим количеством примесей.

Для второй колонки мы выбрали аффинный носитель гепарин-сефарозу, высоко специфичный по отношению к ДНК-связывающим белкам (Рис. 4). Присутствие соли в объединенных фракциях препятствовало бы связыванию белка с носителем, поэтому перед нанесением на гепарин-сефарозу фракции были диализованы против буфера Н.

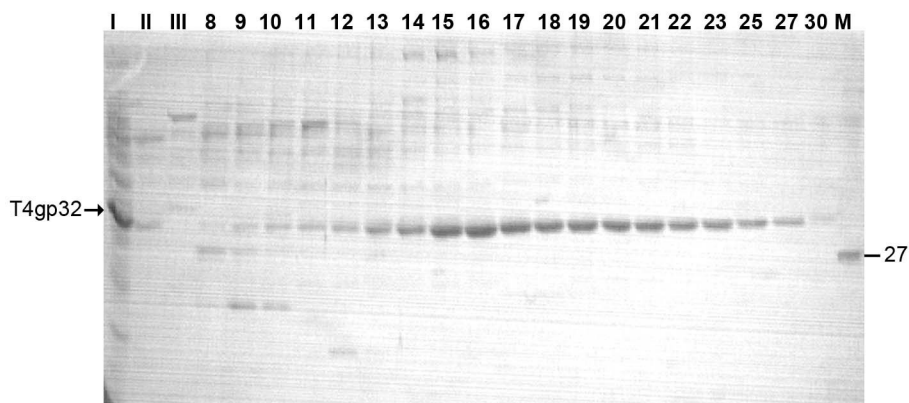


Рис. 4. Анализ фракций после очистки белка T4 gp32 на колонке с гепарин-сефарозой. Электрофорез в Ds-Na – 10% ПААГ. Фракции: I – исходная смесь белков до фракционирования, II – белки, не связавшиеся с носителем на стадии нанесения, III – промывка. Далее указаны номера фракций элюции; M – стандартный белок РНКазы III (27 кДа).

Белок T4gp32 элюировался с колонки широким пиком в диапазоне концентраций NaCl 0,1 – 0,3 М (фракции 13 – 27), тогда как основная масса примесных белков сошла при концентрации NaCl менее 0,1 М.

Хроматография на гепарин-сефарозе, ранее не применявшаяся для очистки T4gp32, оказалась очень эффективной, так как после этой стадии очистки был получен практически электрофоретически чистый белок.

На заключительной стадии очистки использовалась гидрофобная хроматография на фенил-сефарозе (Рис. 5).

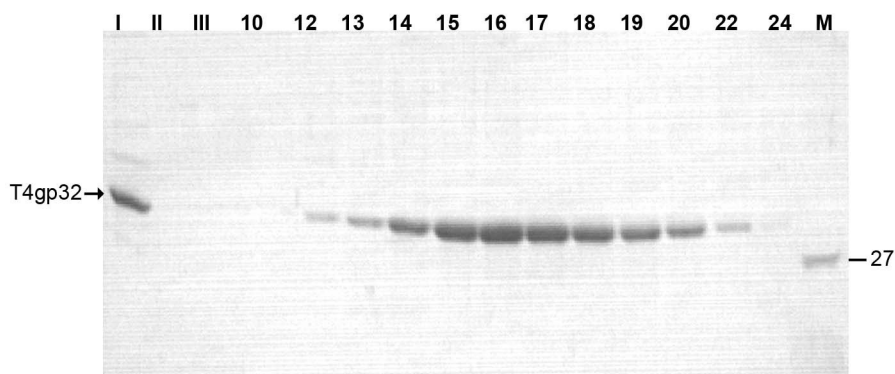


Рис. 5. Анализ фракций, элюированных с фенил-сефарозы. Электрофорез в Ds-Na – 10% ПААГ. Фракции: I – смесь белков до фракционирования, II – белки, не связавшиеся с носителем на стадии нанесения, III – промывка, далее – номера фракций; M – стандартный белок, РНКазы III (27 кДа).

После гепарин-сефарозы мы объединили фракции с 15 по 27, добавили к ним $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 14% и нанесли колонку с фенил-сефарозой. Электрофоретический анализ показал, что во фракциях с 14 по 21 присутствует только белок T4gp32 с молекулярной массой около 33 кДа (Рис. 5). Благодаря небольшому объему колонки (6 мл) мы в значительной степени сконцентрировали белок.

После окончательного диализа против буфера для хранения было получено 10 мл электрофоретически чистого препарата белка с концентрацией 3,5 мг/мл. В результате выход белка составил 3,8 мг на 1 г биомассы. По данным электрофореза в ПАА геле потери белка в ходе очистки составили не более 15 %.

Определение наличия экзо- и эндонуклеазной активностей в препарате белка T4gp32. В связи с использованием белка T4 gp32 при дальнейшей работе с ДНК мы далее проводили тест на отсутствие экзо- и эндонуклеазных активностей в препарате белка. (Рис. 6.).

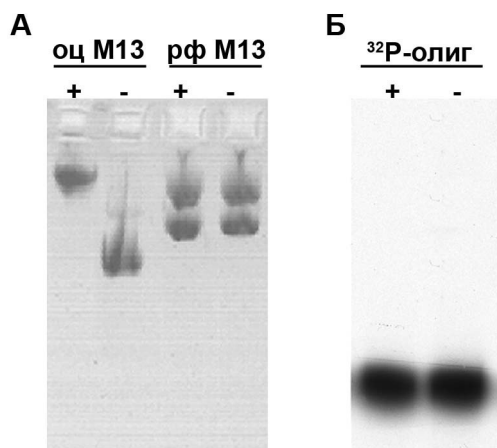


Рис. 6. Тест на отсутствие экзо- и эндонуклеазных активностей в препарате белка.

(А) Определение эндонуклеазной активности. Электрофорез в 1% агарозе оц и репликативной формы ДНК фага М13, инкубированной с белком Т4gp32 (+) и без белка Т4gp32 (-). (Б) Определение экзонуклеазной активности в препарате белка Т4gp32. Электрофорез в 20% ПАА геле с 7 М мочевиной. + – олигонуклеотид, меченый [γ^{32} P] АТФ, инкубированный с белком, – без белка Т4gp32.

Одноцепочечная и репликативная формы ДНК бактериофага М13, а также олигонуклеотид, меченый [γ^{32} P] АТФ, не деградировали при наличии в реакционной смеси белка Т4gp32 (Рис. 6, дорожки со знаком «+»). Это свидетельствует об отсутствии экзо- и эндонуклеазных примесей в препарате, что необходимо при использовании белка в работе с ДНК.

Оценка ДНК-связывающей активности Т4gp32. В качестве показателя функциональных свойств белков SSB проводят определение соотношения, в котором они полностью связывают (насыщают) оцДНК. Ранее было показано, что очищенный белок Т4gp32 связывается с высоким сродством с одноцепочечной ДНК в массовом соотношении 12:1 и не связывается с двухцепочечной ДНК [10]. Мы определяли способность полученного нами белка связываться с ДНК методом торможения в геле (Рис. 7А).

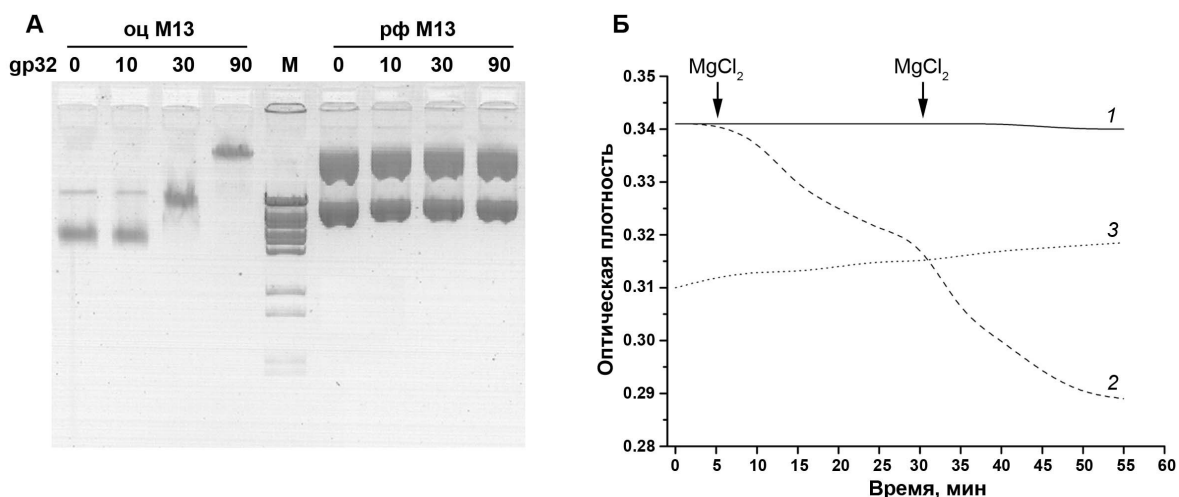


Рис 7. Оценка функциональных свойств белка Т4 gp32.

(А) Оценка ДНК-связывающей активности Т4gp32. Оц и репликативная форма (двухцепочечная) ДНКфага М13 в 1% агарозном геле в присутствии белка Т4 gp32. Сверху указаны количества белка Т4gp32 в мкг/мл, М – маркерные фрагменты ДНК (λ : BstEI). (Б) Ренатурация ДНК в присутствии белка Т4gp32. Изменение оптической плотности ДНК фага Т4 в присутствии белка Т4gp32. Кривая 1 – денатурированная ДНК фага Т4 без белка Т4gp32; 2 – денатурированная фага ДНК Т4 в присутствии Т4gp32 (масс. соотношение ДНК:белок = 1:12); 3 – оц ДНК фага М13. Стрелками указаны моменты добавления $MgCl_2$ до 10 и 40 мМ, соответственно.

Электрофорез в 1%-ном агарозном геле показал, что при соотношении белка к ДНК 12:1 (90 мкг/мл белка) подвижность ДНК замедлялась примерно в 3 раза из-за связавшегося с ней белка. Торможения ДНК при концентрации белка 10 мкг/мл и ниже не происходило. Подвижность двухспиральной ДНК не менялась.

Ренатурация ДНК Т4 в присутствии белка Т4gp32. Для подтверждения функциональных свойств белка мы проводили ренатурацию ДНК фага Т4 в присутствии Т4 gp32. Известно, что реассоциация очищенной ДНК крайне медленный процесс из-за внутрицепочечных взаимодействий денатурированной ДНК, приводящих к образованию шпилек. Однако показано, что скорость ренатурации ДНК резко возрастает при добавлении белка Т4gp32 в присутствии ионов Mg^{2+} [10]. Скорость ренатурации ДНК можно оценить по изменению оптической плотности. В этом случае падение оптической плотности одноцепочечной ДНК будет пропорционально количеству вновь сформированных двойных цепей. Изменение оптической плотности ДНК Т4 в

присутствии 12-кратного массового избытка белка T4gp32 при 25°C проиллюстрировано рисунком 7Б. Без белка gp32 ренатурации ДНК фага T4 в течение часа практически не наблюдали (Рис. 7Б, кривая 1). Когда к денатурированной прогреванием ДНК мы добавляли 12-кратный массовый избыток белка T4gp32, то в этом случае оптическая плотность начинала резко уменьшаться (Рис. 7Б, кривая 2). Оптическая плотность одноцепочечной ДНК фага M13, использованной в качестве контроля, практически не менялась во времени (Рис. 7Б, кривая 3).

Полученные результаты оценки функциональных свойств белка T4 gp32 в точности соответствовали результатам, полученным ранее Альбертсом с соавторами [10].

Выводы

Таким образом, мы разработали новый метод получения электрофоретически гомогенного, функционально активного, свободного от примесей нуклеиновых кислот и нуклеаз белка T4gp32 из сконструированного нами штамма-суперпродуцента. Применение спермина для осаждения нуклеиновых кислот из клеточного лизата позволило уменьшить содержание нуклеиновых кислот без значительной потери выделяемого белка. Хроматография на гепарин-сефарозе, впервые примененная нами для очистки белка T4gp32, может заменить обычно используемую при очистке этого белка хроматографию колонке с иммобилизованной оцДНК. Разработанная нами схема получения белка T4 gp32 может быть рекомендована для получения белка для биомедицинских исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 10-04-01333-а.

Список литературы

- 1 Walker G.T., Linn C.P. // Clin. Chem. 1996. V. 42. P. 1604-1608.
- 2 Lizardi P.M., Huang X., Zhu, Z., Bray-Ward P., Thomas D. C., Ward D. C. // Nature Genetics 1998. V. 19. P. 225-232.
- 3 Vincent M., Xu Y., Kong H. // EMBO report. 2004 V. 5. P. 795 - 800.
- 4 Tan E., Erwin B., Dames, S., Voelkerding K., Niemz A. // Clin. Chem. 2007. V. 53. P. 2017-2020.
- 5 Chou Q., Russell M., Birch D.E., Raymond J., Bloch W. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 1717–1723.
- 6 Inoe J., Shigemore Y., Mikava T. // Nucl. Acids Res. 2006. V. 34. e69.
- 7 Schwarz K., Hansen-Hagge T., Bartram C. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 1079-1080.
- 8 Sandhu D.K., Keohavong P. // Gene. 1994. V. 144. P. 53-58.
- 9 Villalva C., Touriol C., Seurat P., Delsol G., Brousset P. // BioTechniques. 2001. V. 31. P. 81-86.
- 10 Alberts, B., Frey, L. // Nature. 1970. V. 227. P.1313 – 1318.
- 11 Bittner, M., Bruce, R. L, Alberts, B. M. // J. Biol. Chem. 1979.V. 254. P. 9565 – 9572.
- 12 Price, P. A., Lin T-Y., Stain, W., H., Moore, S. // J. Biol. Chem. 1969. V. 244. P. 917 – 923.
- 13 Hosoda J., Takacs B., Brack C. // FEBS lett. 1974. V. 47. P. 338 – 342.
- 14 Moise H., Hosoda J. // Nature. 1976. V. 259. P. 455 – 458.
- 15 De Walt B. W., Murphy J. C., Fox G. E., Willson R. C. // Protein Expression and Purification. 2003. V. 28. P. 220 – 223.
- 16 Sellmann E., Schroder K-L., Knoblich I-M., Westermann P. // J. Bacteriol. 1992. V. 174. P. 4350-4355.
- 17 Матвиенко Н. Н., Крамаров В. М., Железная Л. А., Матвиенко Н. И. // Биохимия. 1993. V. 58. P. 1137-1149.
- 18 Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. М.: Мир, 1984. (Maniatis T., Fritsch E.E., Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold spring harbor laboratory, 1982.)
- 19 Laemmli U. R. // Nature. 1970. V. 227. P. 680-685.
- 20 Krisch H. M., Selzer G. B. // J. Mol. Biol. 1981. V. 148. P. 199 – 218.
- 21 Shamooy Y., Adari H., Konigsberg W. H., Williams K. R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 8844 – 8848.
- 22 Novagen. pET Manual. TB055, 10th edition 2002.

23 *von Hippel P.H., Kowalczykowski S. C., Lonberg N., Newport J. W., Paul L.* // J. Mol. Biol. 1982. V. 162. P. 795 – 818.

24 *Welker E., Varadi A.* // Biochem. and Biophys. Research Communications. 2000. V. 271. P. 534-536.