

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА СВИНОГО ЛЕЙКОЦИТАРНОГО α -ИНТЕРФЕРОНА В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*

М. В. Трубицына, М. И. Потапович, В. А. Прокулевич

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

Интерфероны (ИФНы) - это семейство мультифункциональных белков, обладающих противовирусной, иммуномодулирующей и антипролиферативной активностью.

Изначально ИФНы делили на два основных типа: I тип представляет собой гетерогенную группу белков, включающую ИФН-альфа (α), -бета (β), -дельта (δ), -эпсилон (ϵ), -каппа (κ), -омега (ω), -тау (τ), -зета (ζ) и др., ко II типу относится ИФН-гамма (γ). В последнее время выделяют также III тип интерферонов, куда входят ИФН-лямбда1 (λ_1), - λ_2 и - λ_3 . Наиболее известными представителями группы интерферонов типа I являются ИФН- α и ИФН- β [1, 2].

Кластер генов ИФН- α человека, размером около 400 тысяч пар нуклеотидов находится на коротком плече девятой хромосомы и состоит по меньшей мере из 13 генов ИФН- α и одного псевдогена [3].

У свиньи домашней (*Sus scrofa*) идентифицировано 14 генов, кодирующих α -интерфероны и два псевдогена. Все эти гены лишены интронов и расположены на первой хромосоме [3].

Интерфероны используются для лечения и профилактики большого числа заболеваний человека и животных. В настоящее время в ветеринарии применяются в основном препараты на основе человеческих интерферонов. Однако, несмотря на широкий спектр активности в отношении любых типов вирусов, предполагается, что действие интерферонов в значительной степени видоспецифично и поэтому гетерологичные препараты интерферона, как правило, должны обладать пониженной активностью. Следовательно, для достижения эффекта в лечении, препарат вводится в организм животного в более высокой дозе, что может вызвать развитие аллергических реакций.

Получение и использование интерферонов, свойственных данному виду животного, позволяет полностью снять проблему введения чужеродного белка в организм и возможных негативных последствий, связанных с этим, а также позволит увеличить эффективность действия препаратов, полученных на основе соответствующих интерферонов.

Целью данной работы являлось клонирование и последующая экспрессия гена свиного лейкоцитарного α -интерферона в клетках бактерий *Escherichia coli*.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и плазмиды

Бактерии штамма *E. coli* XL-1 Blue (F' *proAB lacI^qlacZ Δ M15 Tn10(Tc^r)/recA1 endA1 gyrA96(Nal^r) thi-1 hsdR17supE44 relA1 lac*) из коллекции кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ использовали для клонирования рекомбинантных плазмид. В клетках *E. coli* BL21(DE3) (*hsd, gal, λ Cts857, ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7gen1*), лизогенных по бактериофагу λ DE3, содержащему ген РНК-полимеразы бактериофага Т7 под контролем P_{lacUV5}-промотора, и в клетках штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, содержащего амплифицированные копии генов редко встречающихся у прокариот т-РНК, осуществляли индуцибельную экспрессию клонированного гена в системе транскрипции бактериофага Т7 [4, 5].

Плазмиду pUC18 [6] использовали в качестве вектора для определения нуклеотидной последовательности гена свиного лейкоцитарного α -интерферона. Плазмиду pET24b(+) (Novagen) применяли в качестве экспрессионного вектора.

Генно-инженерные методики и ферменты

Тотальную ДНК выделяли согласно Mathew [7].

Конструирование, выделение, рестрикционный анализ рекомбинантных плазмид, проведение Ca^{2+} -зависимой трансформации клеток *E. coli* осуществляли в соответствии с общепринятыми экспериментальными протоколами [8]. В работе использовали ферменты и буферные системы фирмы MBI Fermentas (Литва).

Аmplификация гена свиного лейкоцитарного α -интерферона и конструирование рекомбинантных плазмид

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в смеси стандартного состава [8] с использованием программируемого термостата ThermoHybaid PX2. Параметры циклов амплификации были следующими: первичная денатурация – 5 мин при 94°C; затем 30 циклов: денатурация - 95°C, 30 с, отжиг - 60°C, 30 с, элонгация - 72°C, 40 с, заключительная достройка - 72°C, 5 мин. Амплифицированные фрагменты ДНК, по размерам соответствующие гену свиного лейкоцитарного α -интерферона, очищали путем электрофореза в агарозном геле с последующим выделением соответствующей зоны из агарозы. Выделенный таким образом продукт амплификации вводили в вектор pUC18 по сайтам рестриктаз *Nde* I и *Eco* RI. Клоны, содержащие вставку, отбирали с помощью рестрикционного анализа рекомбинантных плазмид, трансформированных в штамм *E. coli* XL-1 Blue. Нуклеотидная последовательность гена свиного α -интерферона была подтверждена путем секвенирования по методу Сэнгера на секвенаторе ALFexpress II.

Индукция экспрессии клонированного гена и SDS-ПААГ-электрофорез клеточных белков

Бактерии *E. coli* BL21(λ DE3) и *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, наследующие рекомбинантные плазмиды на основе pET24b(+), культивировали в колбах с 10 мл LB-бульона, 20 мкг/мл канамицина при 37°C с перемешиванием при 180 об/мин до оптической плотности 0,5 (λ 595 нм), после чего в среду добавляли индуктор ИПТГ (изопропил- β -D-тиогалактопиранозид) до конечной концентрации 0,5 мМ. После добавления индуктора штаммы культивировали еще 4 часа; анализ синтезированных в клетках белков осуществляли с помощью электрофореза.

Бактериальные клетки из 150 мкл культуральной жидкости осаждали центрифугированием (7000g, 2 мин) и ресуспендировали в 15 мкл буфера для образцов (50 мМ трис-HCl, pH 6,8; 5% SDS; 1,4 М 2-меркаптоэтанол; 10% глицерин; 0,05% бромфеноловый синий) и кипятили на водяной бане в течение 5 мин. Электрофоретический анализ бактериальных белков осуществляли в 16%-ном ПААГ в денатурирующих условиях с 0,1% SDS по методу Laemmli [9]. Гель окрашивали в растворе Кумасси синего R-250.

Результаты и их обсуждение

У свиней-доноров было отобрано 20 мл крови, из которой после стабилизации 0,5 М ЭДТА выделили тотальную ДНК. Выделенную ДНК использовали в качестве матрицы для амплификации гена α -интерферона с помощью полимеразной цепной реакции, для чего на основе имеющихся в базе данных GenBank последовательностей (коды доступа M28623, X57191) сконструировали праймеры Fp-1 (cgccatattgtgtgacctgcctcagaccса, подчеркнут сайт для рестриктазы *Nde* I) и Rp-1 (gcggaattcttaaagcttctccttctctgagtctg, подчеркнуты сайты для рестриктаз *Eco* RI и *Hind* III). Кроме того, в составе сайта для *Nde* I содержится иницирующий кодон ATG (CATATG), а между сайтами для рестриктаз *Eco* RI (GAATTC) и *Hind* III (AAGCTT) – терминирующий кодон.

Для подбора оптимальных условий образования ПЦР-продукта амплификацию проводили при разных температурах отжига праймеров (55-70°C), при этом наибольший выход продукта наблюдался при температуре отжига 60°C.

Ожидаемый размер продукта амплификации для гена свиного α -интерферона равен 525 п. н. В процессе амплификации с праймерами Fp-1 и Rp-1 были получены фрагменты ДНК, соответствующие указанному размеру, что подтверждается результатами электрофоретического анализа.

Полученные фрагменты ДНК обрабатывали рестриктазами *Nde* I и *Eco* RI и лигировали с вектором pUC18. Проведенное секвенирование показало, что нуклеотидная последовательность амплифицированного фрагмента полностью соответствует последовательности гена свиного лейкоцитарного α -интерферона из базы данных.

На следующем этапе ген свиного лейкоцитарного α -интерферона перенесли в вектор экспрессии pET24b(+) по сайтам рестриктаз *Nde* I-*Eco* RI. Полученной рекомбинантной плазмидой, названной pIP2403, был трансформирован штамм *E. coli* BL21 (λ DE3).

Отобранные с помощью ПЦР и рестрикционного анализа клоны, содержащие плазмиду с геном свиного лейкоцитарного α -интерферона, инкубировали с синтетическим аналогом лактозы - ИПТГ для индукции экспрессии гена α -ИФН, однако накопления в бактериальных клетках белка соответствующей молекулярной массы (около 19 кДа) после индукции не наблюдалось (рисунок 1).

1 2 3

Рисунок 1 – SDS-ПААГ-электрофореграмма клеточных белков бактерий *E. coli* BL21 (λ DE3) pIP2403

№1 – белки-стандарты молекулярной массы (сверху вниз – 116 кДа, 66 кДа, 45 кДа, 35 кДа, 25 кДа, 18,4 кДа, 14,4 кДа) (Fermentas SM0431)

№2 - клеточные белки бактерий *E. coli* BL21 (λ DE3) pIP2403 через 4 часа после индукции ИПТГ в концентрации 0,5 мМоль/л

№3 - клеточные белки бактерий *E. coli* BL21 (λ DE3) pIP2403 без индукции ИПТГ

Из литературных данных [10] известно, что различие в частоте встречаемости синонимических аминокислотных кодонов в клетках про- и эукариот может являться одной из причин отсутствия или недостаточно высокого уровня экспрессии гетерологичных генов в бактериальных клетках. Наиболее редко встречающимися кодонами в *E. coli* являются AGG/AGA/CGA (Arg), CTA (Leu), ATA (Ile), CCC (Pro) и GGA (Gly) (Codon Usage Database) [11]. Проведенный анализ показал, что в структурной части гена свиного лейкоцитарного α -интерферона имеется 19 редко встречающихся в *E. coli* аминокислотных кодонов: четырнадцать кодонов для аргинина (AGG/AGA), три кодона для пролина (CCC) и два

кодона для глицина (GGA) причем в двух случаях кодоны для аргинина расположены тандемно (рисунок 2).

```

tgt gac ctg cct cag acc cac agc ctg gct cac acc agg gcc ctg agg
ctc ctg gca caa atg agg aga atc tct ccc ttc tcc tgc ctg gac cac
aga agg gac ttt gga tcc cct cat gag gct ttt ggg ggc aac cag gtc
cag aag gct caa gcc atg gct ctg gtg cat gag atg ctc cag cag acc
ttc cag ctc ttc agc aca gag ggc tcg gct gct gcc tgg aat gag agc
ctc ctg cac cag ttc tac act gga ctg gat cag cag ctc agg gac ctg
gaa gcc tgt gtc atg cag gag gcg ggg ctg gaa ggg acc ccc ctg ctg
gag gag gac tcc atc cgg gct gtg agg aaa tac ttc cac aga ctc acc
ctc tat ctg caa gag aag agc tac agc ccc tgt gcc tgg gag atc gtc
agg gca gaa gtc atg aga tcc ttc tct tcc tcc aga aac ctg caa gac
aga ctc agg aag aag gag

```

Рисунок 2 – Нуклеотидная последовательность структурной части гена свиного лейкоцитарного α -интерферона (№ M28632). Рамкой выделены редко встречающиеся в *E. coli* кодоны

Для оценки влияния на экспрессию гетерологичного гена различия в частоте встречаемости синонимических аминокислотных кодонов в клетках про- и эукариот была проведена трансформация штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, содержащего амплифицированные копии генов редких т-РНК, плазмидой pIP2403 с геном свиного лейкоцитарного α -интерферона.

Результаты показали, что после индукции в клетках штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL происходит значительное накопление белка, соответствующего по размеру свиному лейкоцитарному α -интерферону (рисунок 3).

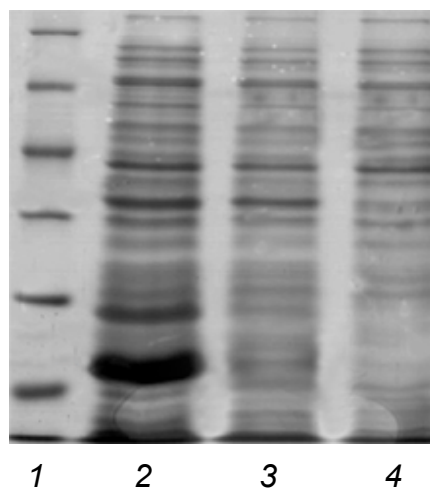


Рисунок 3 – SDS-ПААГ-электрофореграмма клеточных белков бактерий *E. coli* BL21 (λ DE3) pIP2403 и *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL pIP2403

№1 – белки-стандарты молекулярной массы (сверху вниз – 116 кДа, 66 кДа, 45 кДа, 35 кДа, 25 кДа, 18,4 кДа, 14,4 кДа) (Fermentas SM0431)

№2 - клеточные белки бактерий *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL рIP2403 через 4 часа после индукции ИПТГ в концентрации 0,5 мМоль/л

№3 - клеточные белки бактерий *E. coli* BL21 (λ DE3) рIP2403 через 4 часа после индукции ИПТГ в концентрации 0,5 мМоль/л

№4 - клеточные белки бактерий *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL рIP2403 без индукции ИПТГ

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. С использованием сконструированных специфических праймеров амплифицирован и клонирован в бактериях ген свиного лейкоцитарного α -интерферона.

2. Последовательность нуклеотидов ДНК структурной части клонированного гена полностью совпадает с ранее описанными последовательностями генов свиного лейкоцитарного α -интерферона.

3. Полученный белковый продукт по размеру соответствует свиному лейкоцитарному α -интерферону.

4. Причиной отсутствия экспрессии гена свиного лейкоцитарного α -интерферона в немодифицированных клетках *E. coli* являются различия в частоте встречаемости синонимических аминокислотных кодонов у *E. coli* и *S. scrofa*, что оказывает решающее влияние на накопление в бактериальных клетках белка, соответствующего по молекулярной массе белку свиного лейкоцитарного α -интерферона.

Литература

1. Meager A. Biological assays for interferons // J. Immunol. Methods. – 2002. – V. 261. – P.21-36.
2. Randall R. E., Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures // Journal of General Virology. – 2008. – V. 89. – P.1-47.
3. Cheng G., Chen W., Li Z., Yan W., Zhao X., Xie J., Liu M., Zhang H., Zhong Y., Zheng Z. Characterization of the porcine alpha interferon multigene family // Gene. – 2006. – V. 382. – P.28-38.
4. Studier F. W., Moffatt B. A. // J. Mol. Biol. – 1986. – V. 189. – P.113-130.
5. Studier F. W., Rosenberg A. H., Dunn J. J., Dubendorff J. W. // Meth. Enzymol. – 1990. – V. 185. – P.60-89.
6. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors // Gene. – 1985. – V. 33. – P.103-119.
7. Mathew C. G. P. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA // Walker Ed., John M. Methods in molecular biology. Nucleic acids. – Humana Press, 1984. – Chapter 5. - P.32-34.
8. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. Current protocols in molecular biology. – New York: John Wiley & Sons LTD, 1993. – V. 1.
9. Laemmli V. K. // Nature. – 1970. – V. 227. – P.680-685.
10. Guarente L., Roberts T. M., Ptashne M. A technique for expressing eukaryotic genes in bacteria // Science. – 1980. – V. 209. – P.1428-1430.
11. Codon Usage Database, mode of access: <http://www.kazusa.or.jp/codon/>

CLONING AND EXPRESSION OF PORCINE INTERFERON ALPHA GENE IN *ESCHERICHIA COLI* CELLS

M.V. Trubitsyna, M.I. Patapovich, V.A. Prokulevich

Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

Porcine interferon alpha gene was isolated from the whole-blood DNA using PCR with specific primers and sequenced. Then, porcine interferon alpha gene was cloned into expression vector pET24b(+) and recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* strain BL21 (λ DE3). Induction with IPTG doesn't result in accumulation of porcine interferon alpha protein in bacterial cells.

To evaluate the possible influence of the synonymic amino acid codons on expression of porcine interferon alpha gene, recombinant plasmid pIP2403, was transformed into *E. coli* strain BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, which contains additional copies of t-RNA genes for amino acid codons, which are rare in *E. coli*. We showed that codon usage frequency influences on the accumulation level of porcine interferon alpha protein in *E. coli* cells.