

БИОЛОГИЯ



УДК 579.62

М.И. ПОТАПОВИЧ, В.А. ПРОКУЛЕВИЧ

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНА КУРИНОГО ЛЕЙКОЦИТАРНОГО α -ИНТЕРФЕРОНА И ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ ГЕНА НА ЕГО ЭКСПРЕССИЮ В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

Chicken interferon alpha gene was isolated from the whole-blood DNA, sequenced, and cloned into expression vector pET24b(+) and recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* strain BL21 (λ DE3). Induction with IPTG results in accumulation of the protein, having the same molecular weight as chicken interferon alpha.

Effectiveness of eukaryotic gene expression in bacterial cells depends on different factors, first of all on the nucleotide composition of this gene. We showed, that codon usage frequency influences on the accumulation level of the protein with molecular mass equals to chicken interferon alpha in *E. coli* cells.

Интерфероны (ИФНы) представляют собой класс гликопротеинов, обладающих антивирусной, антипролиферативной и иммунорегуляторной активностью.

В настоящее время на основе гомологии аминокислотных последовательностей выделяют два основных типа интерферонов: I и II. Интерфероны I типа образуют большую группу белков, куда входят ИФН-альфа(α), -бета(β), -дельта(δ), -эпсилон(ϵ), -каппа(κ), -омега(ω), -тау(τ), -дзета(ζ) и др. [1–3]. В геноме человека и мыши имеется один ген ИФН- β и более 20 генов различных ИФН- α , из которых 13 являются функциональными. Все эти гены не имеют инtronов и собраны у человека на коротком плече девятой хромосомы, а у мыши – на четвертой хромосоме. Ко II типу относится ИФН- γ , или иммунный интерферон, который имеет интроны и у большинства млекопитающих кодируется одним геном [4].

У курицы домашней (*Gallus gallus*) обнаружено по меньшей мере 10 генов, кодирующих ИФН- α , которые собраны на коротком плече Z-хромосомы, ИФН- β и ИФН- γ представлены одним геном каждый [5].

Цель данной работы заключается в клонировании и последующей экспрессии гена куриного лейкоцитарного α -интерферона в клетках бактерий *Escherichia coli*. Получение очищенного куриного α -интерферона может стать основой для создания соответствующих лечебных и профилактических ветеринарных препаратов.

Материал и методика

Бактериальные штаммы и плазмиды

Бактерии штамма *E. coli* XL-1 Blue (F' *proAB lacI^q/lacZΔM15 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 λclts857, ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7gen1*), лизогенных по бактериофагу λ DE3, содержащему ген РНК-полимеразы бактериофага T7 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 индуцируемую экспрессию целевого гена в системе транскрипции бактериофага T7 [6–8].*

Плазмиду pUC18 (Ap^r, *lacPOZ*) использовали в качестве вектора для определения нуклеотидной последовательности гена куриного лейкоцитарного α -интерферона. Плазмиду pET24b(+) (*Km^r, T7lac*) (широко доступный в настоящее время коммерческий вектор, Novagen) применяли в качестве экспрессионного вектора.

Генно-инженерные методики и ферменты

Тотальную ДНК выделяли согласно [9].

Конструирование, выделение, рестрикционный анализ рекомбинантных плазмид, проведение Ca^{2+} -зависимой трансформации и электрофорез ДНК осуществляли в соответствии с общепринятыми экспериментальными протоколами [10]. В работе использовали ферменты и буферные системы фирмы MBI Fermentas (Литва).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в смеси стандартного состава [10] с использованием программируемого термостата ThermoHybaid RX2. Параметры циклов амплификации были следующими: первичная денатурация – 5 мин при 94 °C; затем 30 циклов: денатурация – 95 °C, 30 с, отжиг – 65 °C, 30 с, элонгация – 72 °C, 40 с, заключительная дстройка – 72 °C, 5 мин. Праймеры для ПЦР были сконструированы на основе информации из базы данных нуклеотидных последовательностей GeneBank. Секвенирование проводили по методу Сенгера на секвенаторе ALF ExpressII.

Электрофоретический анализ бактериальных белков осуществляли в 12 % ПААГ в денатурирующих условиях с 0,1 % SDS по методу [11]. Гель окрашивали в растворе Кумасси синего R-250.

Результаты и их обсуждение

Из данных литературы [12] известно, что куриный лейкоцитарный α -интерферон представляет собой белок размером около 19 кДа, состоящий из 162 аминокислотных остатков. При сравнении аминокислотных последовательностей оказалось, что данный белок имеет низкую степень гомологии (около 24–28 %) с α -интерфероном человека и некоторых других млекопитающих (рис. 1).

		<i>a</i>
Chick-IFN- α	316	HDILQHLFKILSSPSTPAHWNDQSQRQSLLNRIHRYTQHLEQCLDSSDTRSRTRWPR-NLH 492
		H+++Q +F + S+ + A W++ + + + LE C+ + T ++
Hu-IFN- α	58	HEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDEACVIQGVGTETPLMKEDSI 117
Chick-IFN- α	493	LTIKKHFSCILHTFLQDNDYSACAWEHVRLQARAWFLHIHNLTGNTRT 633
		L ++K+F + +L++ YS CAWE VR + F NL + R+
Hu-IFN- α	118	LAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRS 164
Идентичных аминокислот = 26/107 (24 %); положительно заряженных аминокислот = 53/107 (49 %)		
		6
Chick-IFN- α	181	SHDSLQLLRDMAPTLPQLCPQHNASCSFNDTILDTSNTR-QADKTTHDILQHLFKILSS 354
		S +L LLR M P C + F + + + S + QA H++LQ F +L +
Po-IFN- α	34	SRKNLVLLRQMRRRLSPSFCLKDRKDFGFPQEMVEGSQLQKTQAIISVLHEMLQQTFLLHT 93
Chick-IFN- α	355	PSTPAHWNDQSQRQSLLNRIHRYTQHLEQCLDSSDTRSRTWPRLHLTICKHFSCILHTFL 534
		+ A W+ + L + +H++ + LE CL + R L + +K++F +H +L
Po-IFN- α	94	ERSSAAWDSTLLDKLCGLHQHLEDLESCL--VQVRGEQASALEMAVKRYFEGIHLYL 149
Chick-IFN- α	535	QDNDYSACAWEHVRLQ 582
		++ YS CAWE VR++
Po-IFN- α	150	KEKKYSDCAWEIVRVE 165
Идентичных аминокислот = 39/136 (28 %); положительно заряженных аминокислот = 68/136 (50 %)		
		<i>b</i>
Chick-IFN- α	154	HLRPQDATFSHDSLQLLRDMAPTLPQLCPQHNASCSFNDTILDTSNTR-QADKTTHDIL 327
		HL ++ L LL++ P C Q F L S + QA H++
Bo-IFN- α	25	HLPTHSLANRRVLMQLQQLRRVSPSSCLQDRNDFEFIQLQALGGSQLQKAQAIISVLHEVT 84
Chick-IFN- α	328	QHLFKILSSPSTPAHWNDQSQRQSLLNRIHRYTQHLEQCLDSSD-TRSRTWPRLHLTICK 504
		QH F++ S+ +PA W+ S L + + L+ CL + R + L ++
Bo-IFN- α	85	QHTFQLFSTEGSPATWDKSLLDKLRAALDQQLTDLQACLTQEELRGAPLLKEDSSLAVR 144
Chick-IFN- α	505	KHFSCILHTFLQDNDYSACAWEHVRLQARAWFLHIHNLTGNTR 630
		K+F L +LQ+ +S CAWE VR + F NL + R
Bo-IFN- α	145	KYFHRLTLYLQEKRHSPCAWEVVRAEVMRFAFSSSTNLQESFR 186
Идентичных аминокислот = 44/162 (27 %); положительно заряженных аминокислот = 69/162 (42 %)		

Рис. 1. Гомология аминокислотных последовательностей α -интерферона курицы домашней (*Gallus gallus*) (код доступа AAA50213), человека разумного (*Homo sapiens*) (код доступа NP_000596), свиньи домашней (*Sus scrofa domestica*) (код доступа CAA40481) и быка домашнего (*Bos taurus*) (код доступа NP_001017411): аминокислотные последовательности α – α -интерферона курицы (Chick-IFN- α) и человека (Hu-IFN- α); β – β -интерферона курицы (Chick-IFN- α) и свиньи (Po-IFN- α); δ – δ -интерферона курицы (Chick-IFN- α) и быка (Bo-IFN- α).

В качестве матрицы для амплификации гена куриного лейкоцитарного α -интерферона с помощью ПЦР использовалась тотальная ДНК, выделенная из куриной крови. На основе имеющихся в базе данных GeneBank нуклеотидных последовательностей (коды доступа U07868, X92476, X92477, X92478) были сконструированы праймеры F1 (ggccatatgtgcaaccacccctcgccccca, выделен сайт для рестриктазы *Nde* I) и R1 (gcggaaattctaaagcttagtgcgcgttgtgcctg, выделены сайты для рестриктаз *Eco* RI и *Hind* III). Размер продукта амплификации гена куриного α -интерферона равен 513 п. н., что полностью соответствует ожидаемому.

Продукт амплификации встроили в плазмиду pUC18 по сайтам для рестриктаз *Nde* I и *Eco* RI, после чего провели его секвенирование, которое показало, что нуклеотидная последовательность амплифицированного фрагмента полностью соответствует последовательности гена куриного лейкоцитарного α -интерферона из базы данных [13] (рис. 2).

tgc aac cac ctt cgc [ccc] cag gat gcc acc ttc tct cac gac agc ctc
cag ctc ctc cgg gac atg gct [ccc] aca [cta] [ccc] cag ctg tgc cca cag
cac aac ggg tct tgc tcc ttc aac gac acc atc ctg gac acc agc aac
acc cgg caa gcc gac aaa acc acc cac gac ate ctt cag cac ctc ttc
aaa atc ctc agc agc [ccc] agc act cca gcc cac tgg aac gac agc caa
cgc caa agc ctc ctc aac cgg atc cac cgc tac acc cag cac ctc gag
caa tgc ttg gac agc agc gac acg egc tcc cgg acg [cga] tgg cct cgc
aac ctt cac ctc acc atc aaa aaa cac ttc agc tgc ctc cac acc ttc
ctc caa gac aac gat tac agc gcc tgc gcc tgg gaa cac gtc cgc ctg
caa gct cgt gcc tgg ttc ctg cac atc cac aac ctc aca ggc aac acg
cgc act tag

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность структурной части гена куриного лейкоцитарного α -интерферона (№ U07868). Выделены редко встречающиеся в *E. coli* кодоны

На следующем этапе ген куриного лейкоцитарного α -интерферона перенесли в вектор экспрессии pET24b(+) по сайтам рестриктаз *Nde* I-*Eco* RI. Полученными рекомбинантными плазмидами был трансформирован штамм *E. coli* BL21 (λ DE3).

Отобранные с помощью ПЦР и рестрикционного анализа клоны, содержащие плазмиду с геном куриного лейкоцитарного α -интерферона (*E. coli* BL21 (λDE3) (pET24b(+)-Chick-IFN- α)), инкубировали с синтетическим аналогом лактозы ИПТГ (изопропил- β -D-тиогалактопиранозид,

Fermentas, R0392) для индукции экспрессии гена α -ИФН, после чего клетки разрушали кипячением и проводили SDS-ПААГ-электрофорез (рис. 3).

Из данных электрофореза (см. рис. 3) видно, что после индукции бактерий *E. coli* BL21 (λ DE3) (pET24b(+)-Chick-IFN- α) происходит существенное накопление в клетках белка, соответствующего по размеру белку куриного лейкоцитарного α -интерферона (≈ 19 кДа). В то же время данный белок не образуется в клетках бактерий, содержащих исходную плазмиду без вставки, а также в клетках сконструированного штамма без индукции ИПТГ.

Таким образом, присутствие в клетках *E. coli* BL21 (λ DE3) сконструированной рекомбинантной плазмиды pET24b(+)Chick-IFN- α приводит к регулируемому синтезу нового белка, по молекулярной массе идентичного белку куриного лейкоцитарного α -интерферона.

Из литературы [14] известно, что различие в частоте встречаемости синонимических аминокислотных кодонов в клетках про- и эукариот может являться одной из причин 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

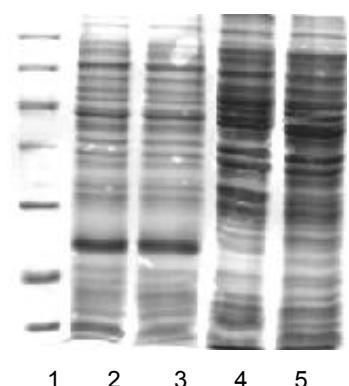


Рис. 3. SDS-ПААГ-электрофорез клеточных белков:

1 – белки-стандарты молекулярной массы (сверху вниз – 116 кДа, 66, 45, 35, 25, 18,4, 14,4 кДа) (Fermentas SM0431);

2, 3 – клеточные белки клонов 1 и 2 бактерий *E. coli* BL21 (λDE3) (рET24b(+)-Chick-IFN- α) через 4 ч после индукции ИПТГ в концентрации 0,5 мМоль/л;

4 – клеточные белки бактерий *E. coli* BL21 (λDE3), содержащих исходную плазмиду T24b(+) без вставки, через 4 ч после индукции ИПТГ в концентрации 0,5 мМоль/л;

клеточные белки бактерий *E. coli* BL21 (λDE3) (рET24b(+)-Chick-IFN- α) без индукции ИПТГ

Usage Database) [15]. Проведенный анализ показал, что в структурной части гена куриного лейкоцитарного α -интерферона имеется шесть редко встречающихся в *E. coli* аминокислотных кодонов: четыре кодона для пролина (CCC) и по одному для лейцина (CTA) и аргинина (CGA), причем три кодона для пролина расположены на достаточно близком расстоянии (см. рис. 2).

Для оценки влияния на экспрессию гетерологичного гена различия в частоте встречаемости синонимических аминокислотных кодонов в клетках про- и эукариот нами была проведена трансформация штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, содержащего амплифицированные копии генов редких т-RНК, рекомбинантной плазмидой pET24b(+), несущей ген куриного лейкоцитарного α -интерферона. Результаты показывают, что после индукции ИПТГ в концентрации 0,5 мМоль/л накопление существенно большего количества белка, соответствующего по размеру куриному лейкоцитарному α -интерферону (\approx 19 кДа), происходит в клетках штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, имеющего амплифицированные копии генов, редко встречающихся у прокариот т-RНК (рис. 4).

Выявленные различия в накоплении белка, соответствующего по размеру куриному лейкоцитарному α -интерферону, в бактериальных клетках косвенно указывают на то, что этот белок является результатом транскрипции и трансляции клонированного фрагмента ДНК, являющегося структурной частью гена куриного α -интерферона.

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

1. С использованием сконструированных специфических праймеров амплифицирован ген куриного лейкоцитарного α -интерферона.
2. Продукт амплификации отсеквенирован и клонирован в вектор экспрессии.
3. Полученный белковый продукт по размеру соответствует куриному лейкоцитарному α -интерферону.
4. Различия в частоте встречаемости синонимических аминокислотных кодонов у *E. coli* и *G. gallus* оказывают значительное влияние на уровень накопления белка, соответствующего по молекулярной массе куриному лейкоцитарному α -интерферону в клетках прокариот.

1. Baccala R., Kono D.H., Theofilopoulos A.N. // Immunol. Rev. 2005. Vol. 204. P. 9.
2. Samuel C.E. // Clinical Microbiol. Rev. 2001. Vol. 14. № 4. P. 778.
3. Cheng G., Chen W., Li Z. et al. // Gene. 2006. Vol. 382. P. 28.
4. Meager A. // J. Immunol. Methods. 2002. Vol. 261. P. 21.
5. Schultz U., Kaspers B., Staeheli P. // Develop. Comparat. Immunol. 2004. Vol. 28. P. 499.
6. Studier F.W., Moffatt B.A. // J. Mol. Biol. 1986. Vol. 189. P. 113.
7. Studier F.W., Rosenberg A.H., Dunn J.J., Dubendorff J.W. // Meth. Enzymol. 1990. Vol. 185. P. 60.
8. Kleber-Janke T., Becker W.M. // Protein Expr. Purif. 2000. Vol. 19. P. 419.
9. Mathew C.G.P. // Methods in molecular biology. Nucleic acids. Humana Press, 1984. Chapter 5. P. 32.
10. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E. et al. // Current protocols in molecular biology. New York, 1993. Vol. 1.
11. Laemmli V.K. // Nature. 1970. Vol. 227. P. 680.
12. Sick C., Schultz U., Staeheli P. // J. Biol. Chem. 1996. Vol. 271. № 13. P. 7635.
13. Sekellick M.J., Ferrandino A.F., Hopkins D.A., Marcus P.I. // J. Interferon Res. 1994. Vol. 14. № 2. P. 71.
14. Guarente L., Roberts T.M., Ptashne M. // Science. 1980. Vol. 209. P. 1428.
15. Codon Usage Database, mode of access: <http://www.kazusa.or.jp/codon/>

Поступила в редакцию 19.09.07.

Максим Иосифович Потапович – аспирант кафедры микробиологии. Научный руководитель – В.А. Прокулевич.
Владимир Антонович Прокулевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии.

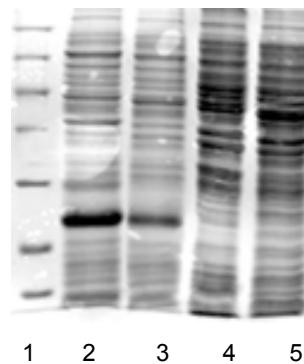


Рис. 4. SDS-ПААГ-электрофорез клеточных белков бактерий штаммов *E. coli* BL21 (λ DE3) и *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, содержащих плазмиду с геном куриного лейкоцитарного α -интерферона:

- 1 – белки-стандарты молекулярной массы (сверху вниз – 116 кДа, 66, 45, 35, 25, 18, 4, 14,4 кДа) (Fermentas SM0431);
- 2 – клеточные белки бактерии *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL (pET24b(+)-Chick-IFN- α) через 4 ч после индукции ИПТГ в концентрации 0,5 мМоль/л;
- 3 – клеточные белки бактерии *E. coli* BL21 (λ DE3) (pET24b(+)-Chick-IFN- α) через 4 ч после индукции ИПТГ в концентрации 0,5 мМоль/л;
- 4 – клеточные белки бактерий *E. coli* BL21 (λ DE3), содержащих исходную плазмиду pET24b(+) без вставки, через 4 ч после индукции ИПТГ в концентрации 0,5 мМоль/л;
- 5 – клеточные белки бактерий *E. coli* BL21 (λ DE3) (pET24b(+)-Chick-IFN- α) без индукции ИПТГ