

ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ЭЛЕКТРОНТРАНСПОРТНОГО КОМПЛЕКСА ЦИТОХРОМ b_5 РЕДУКТАЗА/ЦИТОХРОМ b_5

В.В. Кохановский

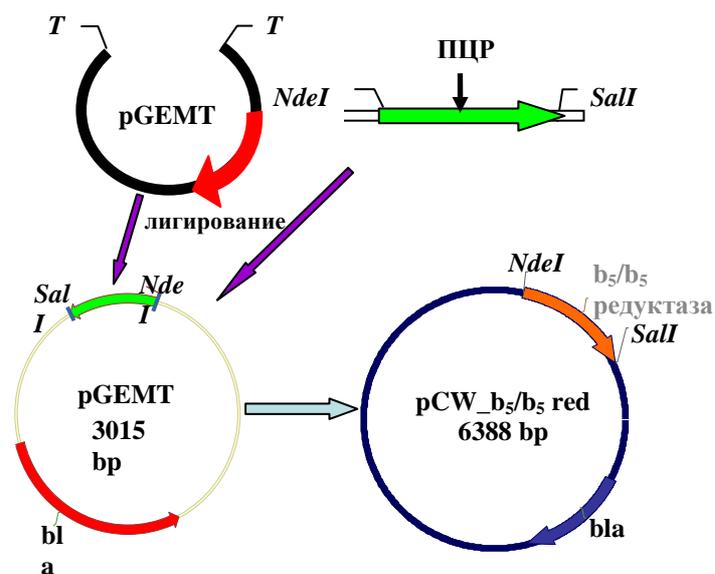
Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь,
kokhanovsky@iboch.bas-net.by

NADH-цитохром b_5 редуктаза /цитохром b_5 представляет собой мембраносвязанный белок с молекулярной массой 48 кДа. Данный белок является флавогемопротеином, т.е. принадлежит к семейству флавопротеинов (NADH-цитохром b_5 редуктаза) и гемопротеинов (цитохром b_5). Комплекс NADH-цитохром b_5 редуктаза /цитохром b_5 выполняет в организме человека комплекс функций, а именно метаболизм глюкозы, удлинение и насыщение жирных кислот, биосинтез холестерина, метаболизм ксенобиотиков, участвует в специфических Р450-опосредованные реакции гидроксирования. Сшитый белок b_5/b_5 редуктаза способен использовать в качестве доноров электронов как NADH, так и NADPH, доказательством чего является восстановление феррицианида и цитохрома с.

Ген b_5/b_5 редуктазы найден у человека, мышей, крыс и нематод и экспрессируется во всех клетках человека. У человека комплекс b_5/b_5 редуктазы содержит гидрофильный домен гема цитохрома b_5 и растворимый (гидрофобный) флавиновый домен b_5 редуктазы. Широкое распространение b_5 редуктазы и цитохрома b_5 как отдельных белков, так и в сшитых формах показывает их древнюю историю и важную роль в различных физиологических процессах.

Цель данной работы – конструирование вектора, разработка эффективной системы гетерологической экспрессии и получение сшитого комплекса белков (цитохром b_5 редуктаза - цитохром b_5) для изучения механизмов внутри- и меж-белкового электронного транспорта

Конструкция экспрессионного вектора цитохрома b_5/b_5 редуктазы приведена на рис.1. Последовательность кДНК, кодирующей микросомальную цитохром b_5/b_5 редуктазу амплифицировалась ПЦР. Продукты амплификации лигировались в рGEMT вектор и лигированная ДНК трансформировалась в клетки *E. Coli*.



Положительные бактериальные трансформанты анализировались с помощью рестрикционного анализа плазмид на присутствие NADH-цитохром b_5/b_5 редуктазы. В дальнейшем продукт ПЦР из вектора рGEMT был клонирован по сайтам *Nde I* и *Sal I* в экспрессионный вектор рCW (с бактериальным Tас промотором).

Рис. 1. Конструирование экспрессионного вектора для гетерологической экспрессии цитохром b_5/b_5 редуктазы.

Ген, кодирующий белок содержит 1461 п.о., что соответствует 493 аминокислотным остаткам. Анализ последовательности показал, что гемовый и флавиновый домены аналогичны доменам микросомального цитохрома b_5 и цитохром b_5 редуктазы соответственно. Ген, кодирующий белок находится в плазмиде pCW под бактериальным Tac промотором. Были проведены эксперименты по увеличению уровня экспрессии. С этой целью проводилась аналитическая экспрессия, когда клетки наращивались до определённой оптической плотности в равных объёмах LB-среды, после чего добавлялся индуктор экспрессии IPTG и уровень экспрессии определялся через определённые промежутки времени (12, 24, 48, 72 часа). Кроме того, использовались различные температурные интервалы и уровень аэрации. Оптимальными оказались следующие условия: 26°C и 150 rpm в течении 48 часов. Синтез рекомбинантного белка происходит в основном в поздней логарифмической и стационарной фазах, поэтому время синтеза достаточно велико (около 48 часов). Важное значение в оптимизации экспрессии имеет место добавление индуктора экспрессии IPTG в культуральную среду. Оптимальное время для индукции составляет 4,5 - 5 ч, после начала инкубации, что соответствует поглощению при 600 нм равному 0,6 - 0,8 о.е.

Для гетерологической экспрессии был выбран штамм *E.coli DH5 α* . Уровень экспрессии составил порядка 3500 нмоль/л культуральной среды. При выделении белка были использованы две стадии очистки. На первой стадии были использована ионообменная хроматография с сорбентом ДЕАЕ-агароза. Гомогенный препарат белка был получен на второй стадии очистки с использованием "blue"-сефарозы. Полученный белок обладает достаточной степенью гомогенности (рис. 2) и чётко видны максимумы его поглощения (рис 3). Окисленная форма имеет пик при 412 нм. При добавлении NADH происходило восстановление белка с характерными максимумами при 424 нм, 527 нм, и 557 нм. Аналогичная картина наблюдалась и при добавлении дитионита натрия (химическое восстановление).

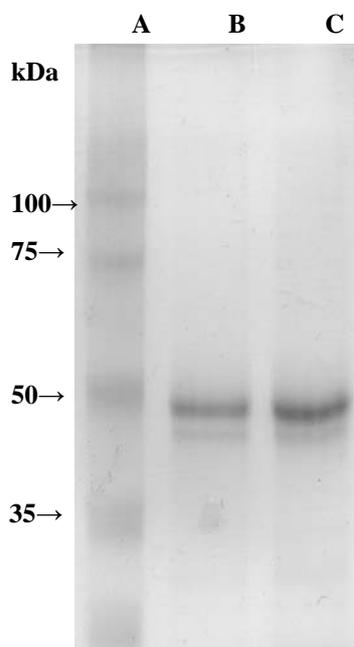


Рис. 2. Электрофорез (12% ПААГ) в присутствии DsNa цитохром b_5/b_5 редуктазы. (А – стандарт 10-250 кДа, В и С – цитохром b_5/b_5 редуктаза).

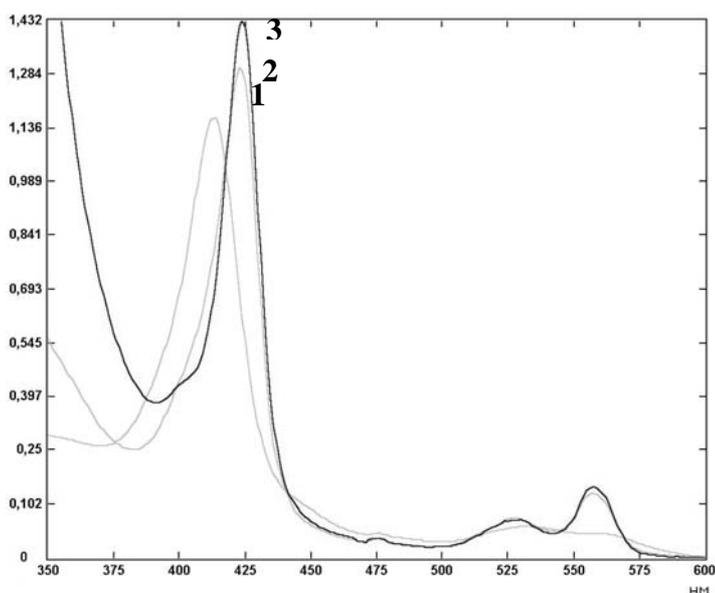


Рис. 3. Спектр поглощения очищенной цитохром b_5/b_5 редуктазы. 1 – окисленная форма, 2 – восстановленная форма (ферментативное восстановление NADH), 3 – восстановленная форма (химическое восстановление $Na_2S_2O_4$).