

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШАПЕРОНОВ НА СИНТЕЗ И ЛОКАЛИЗАЦИЮ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ НА ПРИМЕРЕ ХИМОЗИНА АЛПАКА

Беленькая С.В.^{1,2}, Бондарь А.А.³, Ельчанинов В.В.⁴, Щербаков Д.Н.^{1,5}

¹ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск

⁴Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий,
Сибирский НИИ сыроделия, Барнаул

⁵Алтайский государственный университет, Барнаул

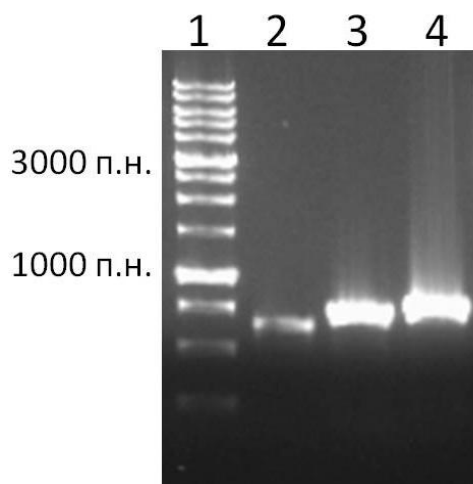
Химозин – это аспарагиновая пептидаза, которая применяется как коагулянт молока в сырной промышленности. В конце XX века сыроделие столкнулось с проблемой дефицита сычужного фермента [3], обусловленной постоянным ростом объемов производства сыров и острой нехваткой сырья – сычугов телят-молокопоек [5, 6]. Развитие методов генной инженерии сместило акцент работ с экстракционного выделения препаратов ферментов из сырья (животного и растительного происхождения) на получения рекомбинантных аналогов химозина. Фактически, с конца 1990-х и по настоящее время, рекомбинантный коровий химозина используется как адекватная технологическая альтернатива натуральному сычужному ферменту [6, 7]. При этом в промышленности используется фермент полученный при помощи грибных продуцентов, *Kluyveromyces lactis* и *Aspergillus niger*. Попытки получения промышленных продуцентов химозина на основе *E. coli*, сталкиваются с сложностью получения нативной структуры фермента после его выделения из телят включения, в которых происходит его накопление. И не смотря на то, что в последние годы было проведено большое число работ по поиску новых вариантов химозинов не коровьего происхождения [1, 2] химозин овцы [9], химозин козы [10, 4] и химозин одnogорбого верблюда [8], для экспрессии всех этих генов использовали системы на основе грибных продуцентов обладающих рядом недостатков.

Целью нашей работы было создание новых векторов обеспечивающих синтез и направленный транспорт рекомбинантного химозина альпаки в системе *E. coli*.

Ранее нами был сконструирован экспрессионный вектор pET21-T7Vic обеспечивающий эффективный синтез прохимозина альпака в системе *E. coli*. При этом весь целевой белок был локализован в тельцах включения. Для проверки рабочей гипотезы о влиянии бактериальных белков-шаперонов (DsbC, DsbG, DsbA, Trx) на локализацию данного белка при синтезе в бактериальной клетке, была проведена следующая работа. На первом этапе была проведена

амплификации генов DsbC, DsbG, Trx и DsbA, для этого были подобраны четыре пары олигонуклеотидов. С использованием синтезированных праймеров, а также *Pfu* полимеразы (Сибэнзим, Россия) были получены ПЦР продукты, чьи длины были сопоставимы с рассчитанными ранее (рисунок 1). В качестве матрицы использовали ДНК *E. coli*.

Рисунок 1 – Электрофорерамма продуктов ПЦР. Обозначения номеров дорожек: 1 – ДНК-маркеры 1 Kb (13 фрагментов от 0,25 до 10 т.п.н., Сибэнзим),



2 – DsbA, 3 – DsbC, 4 – DsbG.

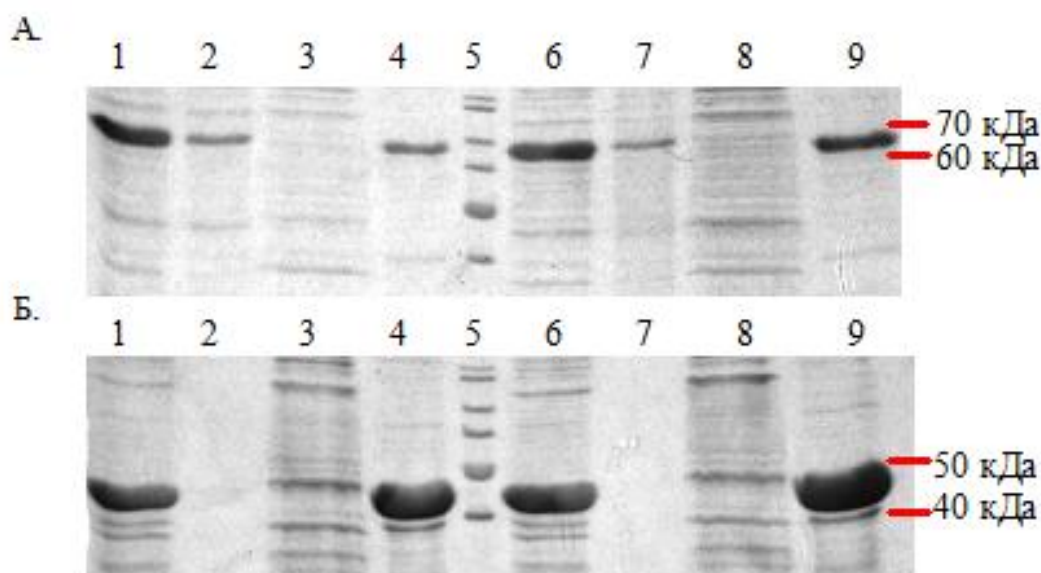
Полученные последовательности клонировали в состав экспрессирующего вектора pET21-T7Vic по заложенным сайтам рестрикции, таким образом что бы «слитый» белок находился в единой рамки считывания. Белки шапероны (DsbC, DsbG, Trx и DsbA) были расположены в N-концевой части химерных белков. На следующем этапе проводилась трансформация полученными рекомбинантными плазмидами компетентных клеток *E. coli* штамма Neb stable с целью отбора трансформантов. Нуклеотидные последовательности полученных плазмид определяли по методу Сенгера для проверки отсутствия делеций и нуклеотидных замен. Секвенирование проводилось в ЦКП Геномика, ИХБФМ СО РАН. В результате были получены четыре плазмиды pET21-DsbC-T7Vic, pET21-DsbG-T7Vic, pET21-DsbA-T7Vic, pET21-Trx-T7Vic обеспечивающих экспрессию химерных рекомбинантных белков включающих прохимозина альпака и бактериальные белки шапероны.

На следующем этапе, сконструированной плазмидой и контрольной плазмидой pET21-T7Vic проводили химическую трансформацию *E. coli* штамм BL21(DE3). Индивидуальные колонии *E. coli*, содержащие рекомбинантные плазмиды, культивировали в шейкер-инкубатор в среде LB при 37°C и 180 об/мин, до оптической плотности D600 = 0,8. Затем проводили индукцию синтеза белка по двум схемам. Первая схема включала в себя добавление IPTG до конечной концентрации 1 мМ. Во второй схеме помимо IPTG к культуре клеток добавляли Triton X-100 до конечной концентрации 0,5%. Колбы вновь

помещали в шейкер-инкубатор и продолжали культивирование 12 часов при 20°C и 160 об/мин.

Для выделения различных фракций клеток, биомассу осаждали центрифугированием в течении 20 минут при 5000 g и 4°C. Полученный осадок растворяли в буфере STET (8% сахара, 50 мМ Трис, 20 мМ ЭДТА, 5% Triton X-100, pH 8) из расчета 20 мл на 1 грамм биомассы и инкубировали в течении ночи при 4°C. После завершения инкубации клетки разрушали с использованием ультразвукового гомогенизатора Soniprep 150 Plus («MSE», Китай). Тельца включения осаждали центрифугированием при 20000 g 20 мин 4°C и растворяли в денатурирующем буфере (50 мМ KH_2PO_4 , 8 М мочевины, pH 10,7).

С целью оценки эффективности синтеза рекомбинантного прохимозина альпака, а также определения его локализации был проведен электрофоретический анализ различных фракций, полученных из культур клеток рекомбинантных штаммов-продуцентов. Результаты анализа представлен на примере штамма трансформированного плазмидой pET21-DsbA-T7Vic, а также pET21-T7Vic (в качестве контроля) (рисунок. 2).



1 – биомасса клеток *E. coli* через 24 часа после добавления IPTG, 2 – культур. жидкость, 3 – растворимая фракция биомассы клеток *E. coli*, после обработки буфером STET и центрифугирования, 4 – нерастворимая фракция биомассы клеток *E. coli* после обработки денатурирующим буфером и центрифугирования (тельца включения), 5 - маркеры молекулярных масс, 6 – биомасса клеток *E. coli* через 24 часа после добавления IPTG и Triton X-100, 2 – культур. жидкость, 3 – растворимая фракция биомассы клеток *E. coli*, после обработки буфером STET и центрифугирования, 4 – нерастворимая фракция биомассы клеток *E. coli* после обработки денатурирующим буфером и центрифугирования (тельца включения).

Рисунок 2 – Электрофореграммы разделения белковых препаратов в ПААГ в денатурирующих условиях. А. pET21-DsbA-T7Vic, Б. pET21-T7Vic.

В результате проделанной работы было показано что введение в N-концевую часть прохимозина альпака бактериальных белков шаперонов DsbC, DsbG и DsbA, позволяет изменить локализацию химерных белков. При добавление в ростовую среду Triton X-100 (0,5%) значительная часть целевых белков транспортируется во внеклеточное пространство.

Литература

1. Бельняк С.В., Ельчанинов В.В., Щербаков Д.Н. Получение рекомбинантных аналогов прохимозинов *Vicugna pacos* и *Camelus ferus* в системе *E. coli*. IV Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов – 2017 : Сб. тез. / Новосиб. гос. ун-т. – Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2017. С. 3-5.
2. Ельчанинов В.В. Молокосвертывающий фермент из сычугов северного оленя. Сыроделие и маслоделие. 2006, № 4, С. 42-44.
3. Birkkjaer H., Jonk P. Technological suitability of calf rennet substitutes. International Dairy Federation Bulletin. 1985, № 194, P. 8-13.
4. Eskandari, M. H., Hosseini, A., & Aminlari, M. . Nucleotide sequence of cDNA encoding for preprochymosin in native goat (*Capra hircus*) from Iran. Iranian Journal of Veterinary Research. 2008. №. 9(3). P. 262-265.
5. Feijoo-Siota L., Blasco L., Rodríguez-Rama J.L., Barros-Velázquez J., De Miguel T., Sánchez-Pérez A, Villa T.G. Recent patents on microbial proteases for the dairy industry. Recent Advances in DNA and Gene Sequences. 2014, V. 8, №. 1. P. 44-55. doi:10.2174/2352092208666141013231720.
6. Harboe, M., M. L. Broe, and K. B. Qvist. "The production, action and application of rennet and coagulants." Technology of Cheesemaking, Second Edition 2010. P. 98-129.
7. Isselante S., Boudjenah-Haroun S., Nouani A., Ahmed-Zennia S.S., Bouazza B., Yabrir B., Mati A. Molecular characterization of crude enzymatic extract from Algerian camel abomasum (*Camelus dromedarius*). Emirates Journal of Food and Agriculture. 2016. Vol. 28, №. 3. P. 217-223. doi:10.9755/ejfa.2015-07-490.
8. Kappeler, S., Farah, Z., van den Brink, J. M., Rahbek-Nielsen, H., & Budtz, P. (2016). U.S. Patent No. 9,307,775. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
9. Rogelj, I., Perko, B., Francky, A., Penca, V., & Pungertar, J. . Recombinant lamb chymosin as an alternative coagulating enzyme in cheese production. Journal of dairy science, 2001. №. 84(5). P. 1020-1026.
10. Vega-Hernández, M. C., Gómez-Coello, A., Villar, J., & Claverie-Martín, F. Molecular cloning and expression in yeast of caprine prochymosin. Journal of biotechnology, 2004. №. 114(1). P. 69-79.