

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

Interferons are known as a big group of proteins, which have strong nonspecific antiviral activity and are able to induce non-susceptibility of cells of the organism to different viruses. Also, interferons play a great role in protection from infections, caused by microorganisms, and possess powerful antiproliferative and immunomodulatory activity. Purposes of the study were cloning and expression of horse leukocyte interferon alpha gene in *E. coli* cells. As a result, accumulation of the protein having the same molecular weight as horse interferon alpha was observed.

Интерфероны являются многофункциональными компонентами защиты против вирусных и паразитарных инфекций и некоторых опухолей. Они представляют собой класс гликопротеинов, обладающих антивирусной, антипролиферативной и иммунорегуляторной активностью.

В настоящее время выделяют три основных типа интерферонов.

К типу I относят большую группу белков, куда входят ИФН-альфа, -бета, -дельта, -каппа, -омега и др.

К типу II относится ИФН-гамма, или иммунный интерферон.

В последнее время выделяют также III тип интерферонов, куда входят ИФН-лямбда 1 (λ), $-\lambda 2$ и $-\lambda 3$.

У лошади (*Equus caballus*) обнаружено по меньшей мере 4 гена, кодирующих ИФН-альфа, которые собраны на хромосоме 23.

Цель данной работы заключается в клонировании и последующей экспрессии гена лошадиного α -интерферона в клетках бактерий *E. coli*.

Материал и методика

Бактериальные штаммы и плазмиды

Бактерии штамма *E. coli* XL-1 Blue (F^+ *proAB lac^flacZAM15 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(λ DE3) (*hsd, gal, λ Its857, 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)-RPL, содержащего амплифицированные копии генов редко встречающихся у прокариот т-РНК, осуществляли индуцибельную экспрессию целевого гена в системе транскрипции бактериофага Т7 [1, 2].

Плазмиду pUC18 использовали в качестве вектора для клонирования последовательности гена лошадиного α -интерферона. Плазмиду pET24b(+) применяли в качестве экспрессионного вектора.

Генноинженерные методики и ферменты

Тотальную ДНК выделяли согласно [3]. Конструирование, выделение, рестрикционный анализ рекомбинантных плазмид, проведение Ca^{2+} -зависимой трансформации и электрофорез ДНК осуществляли в соответствии с общепринятыми экспериментальными протоколами.

В работе использовали ферменты и буферные системы фирмы «Fermentas» (Литва).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) [4, 5] проводили в смеси стандартного состава с использованием программируемого термостата Veriti.

Секвенирование осуществляли по методу Сэнгера на секвенаторе ALF ExpressII.

Электрофоретический анализ бактериальных белков проводили в 16 % ПААГ в денатурирующих условиях с 0,1 % ДСН (додецилсульфат натрия) по методу Laemmli [6]. Гель окрашивали в растворе Кумасси синего R-250.

Результаты и их обсуждение

В качестве матрицы для амплификации гена лошадиного лейкоцитарного α -интерферона с помощью ПЦР использовалась тотальная ДНК, выделенная из лошадиной крови. На основе имеющихся в базе данных GenBank нуклеотидных последовательностей (коды доступа M14540, M14541, M14542, M14543) были сконструированы праймеры CabF1 и CabR1 (таблица).

Характеристика праймеров CabF1 и CabR1

Название	Последовательность 5'-3' (сайты для рестриктаз подчеркнуты)	Рестриктазы
CabF1	5-GGCCATATGTGTGACCTGCCTCACACCCATAGCCTG GGC-3	<i>Nde</i> I
CabR1	5-GCGGAATTCGATAAAGCTTACTCTGCTGCAAGTTTGTGGATGAAGAGAA-3	<i>Eco</i> RI, <i>Hind</i> III

Для оптимизации ПЦР амплификацию проводили при разных температурах отжига праймеров (50 °С, 55, 60 и 65 °С), в результате чего было установлено, что наибольший выход целевого продукта наблюдается при температуре 55 °С.

Размер продукта амплификации гена лошадиного α -интерферона составил 510 п. н., что полностью соответствует ожидаемому (рис. 1).

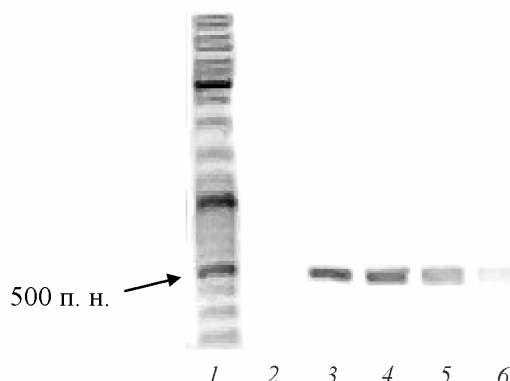


Рис. 1. Результаты амплификации гена лошадиного лейкоцитарного α -интерферона с помощью ПЦР при разных температурах отжига праймеров. Дорожки: 1 – маркер молекулярного веса (Fermentas SM0333); 2 – отрицательный контроль; 3 – образование продукта амплификации при температуре отжига праймеров 50 °С; 4 – образование продукта амплификации при температуре отжига праймеров 55 °С; 5 – образование продукта амплификации при температуре отжига праймеров 60 °С; 6 – образование продукта амплификации при температуре отжига праймеров 65 °С

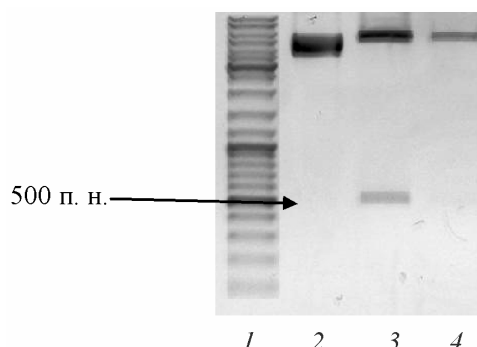


Рис. 2. Электрофореграмма результатов рестриционного анализа плазмиды рМ14541. Дорожки: 1 – маркер молекулярного веса (Fermentas SM0333); 2 – плаزمида рЕТ24b(+), не обработанная рестриктазами; 3 – плазмида рМ14541 с геном лошадиного интерферона, обработанная рестриктазами *Nde* I и *Eco* RI; 4 – плазмида рЕТ24b(+), обработанная рестриктазами *Nde* I и *Eco* RI

Продукт амплификации встроили в плазмиду рUC18 по сайтам для рестриктаз *Nde* I и *Eco* RI, после чего гибридной ДНК трансформировали клетки *E. coli* XL-1 Blue. Отбор клонов, несущих в плазмиде ген лошадиного α -интерферона, производили на селективной среде ЕМВ. Наличие вставки целевого гена проверяли с помощью ПЦР и рестриционного анализа.

Из унаследовавших рекомбинантную плазмиду клонов была выделена плазмидная ДНК и проведено секвенирование клонированной последовательности, которое показало, что нуклеотидная последовательность амплифицированного фрагмента полностью соответствует последовательности гена лошадиного лейкоцитарного α -интерферона из базы данных.

На следующем этапе работы ген лошадиного лейкоцитарного α -интерферона переклонировали в вектор экспрессии рЕТ24b(+) по сайтам рестриктаз *Nde* I и *Eco* RI. Полученной рекомбинантной плазмидой, названной рМ14541, были трансформированы клетки *E. coli* XL-1 Blue (рис. 2).

На следующем этапе работы плазмидой рМ14541 трансформировали штамм *E. coli* BL21(λ DE3), после чего клоны, унаследовавшие рекомбинантную плазмиду, выращивали в присутствии ИПТГ (изопропил- β -D-тиогактопиранозид) для индукции экспрессии гена лошадиного α -интерферона. Результаты представлены на рис. 3.

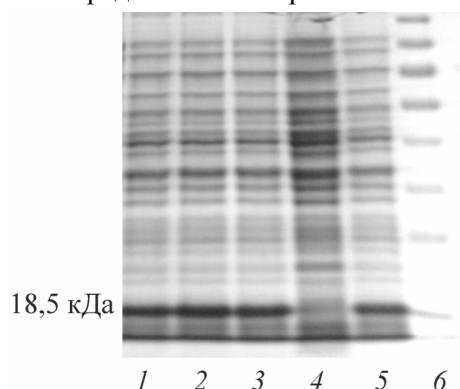


Рис. 3. ДСН-ПААГ-электрофореграмма клеточных белков бактерий *E. coli* BL21 (λ DE3). Дорожки: 1, 2, 3, 5 – клеточные белки клонов 1, 2, 4, 6 бактерий *E. coli* BL21 (λ DE3)-рМ14541 через 4 ч после индукции ИПТГ в концентрации 0,5 ммоль/л; 4 – клеточные белки бактерий *E. coli* BL21 (λ DE3)-рМ14541 без индукции ИПТГ; 6 – белки-стандарты молекулярной массы (сверху вниз – 170, 130, 95, 72, 55, 43, 26, 10 кДа) (Fermentas SM0671)

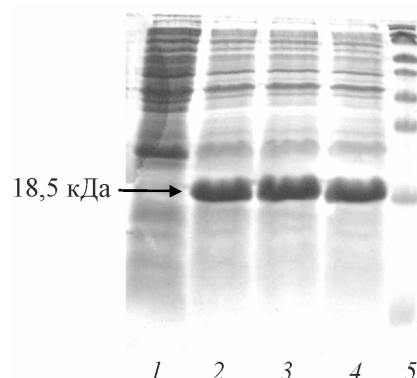


Рис. 4. ДСН-ПААГ-электрофореграмма клеточных белков бактерий *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. Дорожки: 1 – клеточные белки бактерий *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL-pM14541 без индукции ИПТГ; 2, 3, 4 – клеточные белки клонов 6, 10, 13 бактерий *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL-pM14541 через 4 ч после индукции ИПТГ в концентрации 0,5 ммоль/л; 5 – белки-стандарты молекулярной массы (сверху вниз – 170, 130, 95, 72, 55, 43, 26, 10 кДа) (Fermentas SM0671)

Полученные результаты свидетельствуют о том, что после индукции ИПТГ в бактериальных клетках, содержащих рекомбинантную плазмиду, наблюдается накопление белка, соответствующего по молекулярной массе лошадиному α -интерферону (около 18,5 кДа). Однако уровень накопления белкового продукта был относительно невысоким для экспрессионных систем такого рода (11,3 % от общего белка клетки согласно данным анализа цифровых фотографий с помощью программы TotalLab 2.0 («Nonlinear Dynamics Ltd.», Великобритания)).

Одной из причин отсутствия или недостаточно высокого уровня экспрессии гетерологичных генов в бактериальных клетках может являться различие в частоте встречаемости синонимических аминокислотных кодонов в клетках про- и эукариот.

Для проверки этой гипотезы рекомбинантной плазмидой pM14541 с геном лошадиного альфа-интерферона был трансформирован штамм *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, содержащий дополнительные копии генов редких для прокариот т-РНК. Клетки выращивали в присутствии ИПТГ для индукции экспрессии гена лошадиного α -интерферона (рис. 4).

Полученные результаты показали, что после индукции клеток штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, содержащих рекомбинантную плазмиду pM14541 с геном лошадиного α -интерферона, накопление целевого продукта составило 55,6 % (согласно данным анализа цифровых фотографий с помощью программы TotalLab 2.0), что примерно в 5 раз выше, чем в клетках бактерий *E. coli* BL21 (λ DE3) после культивирования в тех же условиях.

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

- 1) с использованием сконструированных специфических праймеров амплифицирован ген лошадиного α -интерферона; продукт амплификации отсекается и клонирован в вектор экспрессии;
- 2) накапливающийся в бактериальных клетках в ходе индуцибельной экспрессии клонированного гена белок по размеру соответствует лошадиному лейкоцитарному α -интерферону;
- 3) различия в частоте встречаемости синонимических аминокислотных кодонов у *E. coli* и *E. caballus* оказывают существенное влияние на накопление в бактериальных клетках белка, соответствующего по молекулярной массе лошадиному лейкоцитарному α -интерферону.

1. Studier F. W., Moffatt B. A. // J. Mol. Biol. 1986. Vol. 189. P. 113.
2. Studier F. W., Rosenberg A. H., Dunn J. J., Dubendorff J. W. // Meth. Enzymol. 1990. Vol. 185. P. 60.
3. Mathew C. G. P. // Walker Ed., John M. Methods in molecular biology. Nucleic acids. New York, 1984. Ch. 5. P. 32.
4. Hay F. C., Westwood O. M. R. // Practical Immunology. New Jersey, 2002. P. 157.
5. Steffen C. E. // PCR Applications Manual. Mannheim, 1999.
6. Laemmli V. K. // Nature. 1970. Vol. 227. P. 680.

Поступила в редакцию 07.09.11.

Арафат А. Муттар – аспирант кафедры микробиологии. Научный руководитель – В.А. Прокулевич.

Максим Иосифович Потапович – заведующий НИЛ биотехнологии.

Владимир Антонович Прокулевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии.