

УДК 577.151.57: 577.152.344: 577.151.7: 579.66

## ПОЛУЧЕНИЕ ПРОДУЦЕНТА ПРОТЕАЗЫ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ

**Рябченко А.В., Котова М.В., Поляков Л.М.**

*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биохимии», Новосибирск, e-mail: ibch@niibch.ru*

В работе представлен материал по получению продуцента фермента известного как протеаза вируса табачной мозаики (tobacco etch virus – TEV). В качестве хозяйских клеток использовались клетки *E. coli* шт. BL21 (DE3). Ген TEV-протеазы был оптимизирован для экспрессии в клетках *E. coli*. Для лучшей растворимости фермента в цитоплазме клеток, оптимизированный ген TEV-протеазы был слит с геном мальтозо-связывающего белка (MBP), домен TEV-протеазы располагался с С-конца. Между доменами MBP и TEV-протеазы был встроено участок, кодирующий сайт гидролиза TEV-протеазы и 6 а.о. гистидина, что позволяло химерному белку расщепляться на два отдельных полипептида в цитоплазме клеток и в последующих стадиях очищать TEV-протеазу с помощью аффинной хроматографии. В результате выход фермента в среднем составлял 50 мг с литра культуры клеток продуцента.

**Ключевые слова:** протеаза вируса табачной мозаики, TEV-протеаза, рекомбинантный фермент, *E. coli*

## CONSTRUCTION PROTEASE PRODUCERS OF TOBACCO ETCH VIRUS

**Ryabchenko A.V., Kotova M.V., Polyakov L.M.**

*The Research Institute of Biochemistry, Novosibirsk, e-mail: ibch@niibch.ru*

The paper presents data on the construction of the producer protease encoded by the tobacco etch virus (TEV protease). To clone used cells *E. coli* strain BL21 (DE3). TEV protease gene has been optimized for expression in *E. coli*. For better solubility of the enzyme in the cytoplasm of cells, TEV protease gene was fused with the gene of maltose binding protein (MBP), TEV protease domain located C-terminus of the polypeptide. Between BMP and TEV protease was inserted TEV protease cleavage site and 6 histidine residues (polyhistidine tag). This allowed the chimeric polypeptide is cleaved for two separate peptides in the cell and subsequently purified TEV protease by affinity chromatography. The resulting enzyme yield averaged 50 mg per liter of cell culture.

**Keywords:** TEV protease, recombinant enzyme, *E. coli*

В генной инженерии широко используется прием слияния различных белков в виде химерных полипептидов с последующим их расщеплением. Для расщепления химеров используются специфические и недорогие ферменты. Одним из таких ферментов является каталитический домен белка ядерного включения (nuclear inclusion protein) вируса табачной мозаики. Фермент имеет молекулярную массу около 29 кДа и может быть получен в клетках *E. coli* [2, 3]. Однако белок при сверхэкспрессии, как и многие гетерологичные белки для *E. coli*, имеет тенденцию накапливаться в виде телец включения, что затрудняет его последующее извлечение из клеток в нагивных условиях с сохранением каталитической активности [4]. В связи с этим, в литературе появились работы, использующие различные приемы для увеличения растворимости фермента в цитоплазме, в частности, имеется публикация, в которой авторы попытались внести мутации в структуру фермента с целью увеличения его накопления в цитоплазме [7]. Авторы смогли увеличить выход фермента в 5 раз, по сравнению с аналогичной системой, где использовался дикий тип гена. Так же известны работы, в которых фермент получали в виде слитого полипептида с мальтозо-связывающим

белком (MBP) [3, 6]. Полипептид в клетке накапливался в цитоплазме и был способен к саморасщеплению и высвобождению TEV-протеазы. Следует так же отметить, что в этих работах использовался ген протеазы «дикого» типа. Мы предположили, что объединив эти две стратегии и оптимизировав структуру гена для экспрессии в клетках *E. coli* можно добиться существенного повышения уровня синтеза фермента в клетках. Таким образом, целью нашего исследования являлось конструирование продуцента на основе клеток *E. coli* с высоким выходом TEV-протеазы в растворимой форме.

### Материалы и методы исследования

*Получение рекомбинантной ДНК, кодирующей химерный полипептид MBP-TEV-протеаза.* При конструировании модели рекомбинантной ДНК за основу была взята известная структура гена (giM15239.1(TEVGEN:6256-6981) в базе данных National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/335201>). Анализ частоты встречаемости редких кодонов в геноме *E. coli* проводили с помощью программы интернет-ресурса «Классической и молекулярной биологии» ([http://molbiol.ru/scripts/01\\_11.html](http://molbiol.ru/scripts/01_11.html)). Рекомбинантная ДНК размером 792 п.н. была синтезирована из нуклеотидов по принципу «de novo» фирмой «DNA 2.0» (США) и была встроена в состав экспрессиру-

ющего вектора pD441-mbr. В результате в плазмиде под контролем промотора T5 в одной рамке считывания находилась рекомбинантная ДНК, размером 1890 п.н., кодирующая химерный полипептид MBP-TEV-протеаза (625 а.о., примерная молекулярная масса – 70 кДа).

**Трансформация клеток *E. coli*.** Трансформацию клеток полученной плазмидой проводили с помощью электропорации согласно методике фирмы – производителя прибора («PeqLab, Biotechnologie GmbH», Германия). Клоны *E. coli*, содержащие плазмиду, отбирали на селективной агаризованной среде LB (lysogeny broth), содержащей канамицин 30 мкг/мл.

**Экспрессия химерного полипептида MBP-TEV-протеазы, наработка биомассы клеток продуцентов.** Для экспрессии полипептида использовали клетки *E. coli* шт. BL21(DE3). Из отобранного клона *E. coli* выращивали ночную культуру в среде LB объемом 5 мл при 37°C. На следующий день ночную культуру переносили в двухлитровую колбу с 500 мл свежей среды LB, содержащей канамицин 30 мкг/мл. Клетки выращивали при активном перемешивании и 37°C до оптической плотности  $D_{600} = 0,8-1,2$  о.е. Для анализа отбирали пробу (контроль) и добавляли индуктор – изопропил-β-D-1-тиогаляктопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации в среде 0,5 мМ. Далее клетки инкубировали 4 ч при аналогичных условиях, либо при 30°C. По окончании инкубации отбирали пробу для анализа (опытный образец). Клетки осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин, осадок использовали для выделения фермента. Клеточные лизаты и белки анализировали в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) по Лэмбли, белки окрашивали красителем «Кумасси бриллиантовый синий R-250».

**Выделение TEV-протеазы.** Клетки *E. coli* в фосфатно-солевом буфере разрушали обработкой ультразвуком (УЗГ 13-0,1/22, ФГУП «ВНИИТВЧ», Россия). Клеточный лизат отделяли от дебриса центрифугированием 20 мин при 15000 об/мин. Дебрис экстрагировали 20 мин 8М мочевиной, осаждали 10 мин 10000 об/мин, супернатант использовали для анализа в ПААГ. Выделение и очистку фермента из лизата клеток осуществляли с помощью аффинной хроматографии на колонке с Ni-NTA-сефарозой CL-6B в нативных условиях, согласно протоколу фирмы-производителя аффинного сорбента «Quiagen» («Quiagen», Германия). Целевой белок элюировали фосфатно-солевым буфером, содержащим 250 мМ имидазола, 2 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты ЭДТА) и 2 мМ дитиотреитола (ДТТ), pH 7,5. От имидазола фермент очищали с помощью диализа в фосфатно-солевом буфере, содержащем 2 мМ ЭДТА и 2 мМ ДТТ. Концентрацию белка измеряли спектрофотометрически при  $\lambda = 280$  нм. К ферменту добавляли равный объем 100% глицерина, раствор перемешивали и хранили при – 20°C.

### Результаты исследования и их обсуждение

С целью оптимизации кодонов для экспрессии в клетках *E. coli* в структуру гена TEV-протеазы был внесен ряд замен – 34 синонимические замены кодонов, были заменены все кодоны с частотой встречаемости менее 10 кодонов на 1000. Кроме того, были сделаны четыре замены

аминокислот согласно работам [2] и [7], а именно: S219V, T17S, N68D и I77V. Замена S219V уменьшает неспецифическую автокаталитическую активность примерно в 100 раз по сравнению с диким типом фермента, тем самым фермент остается более стабильным [2]. Замены T17S, N68D и I77V приводят к большей цитоплазматической растворимости фермента, при сохранении его каталитической активности [7]. Для саморасщепления полипептида MBP-TEV-протеаза и последующей очистки фермента с помощью аффинной хроматографии с 5'-конца гена TEV-протеазы был добавлен фрагмент ДНК, кодирующий сайт эндонуклеазы рестрикции KpnI, глицин, сайт TEV-протеазы (ENLYFQ/G), 6 а.о. гистидина и глицин:

5'-GGTACCGGCGAAACCTGTATTTT CAGGGCCACCATCATCATCATGGC-3'.

С 3'-конца гена был добавлен фрагмент ДНК, кодирующий стоп-кодон и сайт эндонуклеазы рестрикции XhoI:

5'-ТААСТААГСТААСТСГАГ-3'.

В результате экспрессии гена химерного полипептида в составе экспрессирующего вектора в клетках *E. coli* шт. BL21(DE3) был получен рекомбинантный белок с молекулярной массой ~ 29 кДа (рис. 1, дор. 3). Выход TEV-протеазы из биомассы, полученной индукцией клеток в течение 4 ч при 30°C и концентрации индуктора 0,5 мМ, составлял ~ 50 мг с литра культуры клеток (рис. 1, дор. 8). Следует отметить, что анализ экстракта осадка (дебриса) 8М мочевиной, после стадии разрушения клеток ультразвуком, не обнаружил фермента (рис. 1, дор. 4), фермент практически весь оставался в клеточном лизате (рис. 1, дор. 5). Это свидетельствует о том, что фермент являлся растворимым в цитоплазме и/или периплазме и не накапливался в тельцах включения.

Дорожки: 1, 9 – маркерные белки (бичий сывороточный альбумин 66 кДа, рекомбинантный апоА-I 33,5 кДа [1], нативный апоА-I 27 кДа [1], лизоцим 14,5 кДа); 2 – лизат клеток инкубированных без добавления индуктора (контроль); 3 – лизат клеток инкубированных с индуктором 0,5 мМ (биомасса для выделения белка); 4 – фракция клеточного дебриса после разрушения ультразвуком; 5 – фракция супернатанта после разрушения ультразвуком; 6 – фракция после прохождения колонки со смолой; 7 – промывочная фракция; 8 – очищенный фермент TEV-протеаза (~ 29 кДа), фракция, элюированная 250 мМ имидазолом; 10 – фракция, элюированная 250 мМ имидазолом, при выделении фермента из клеток, инкубированных при 20°C.

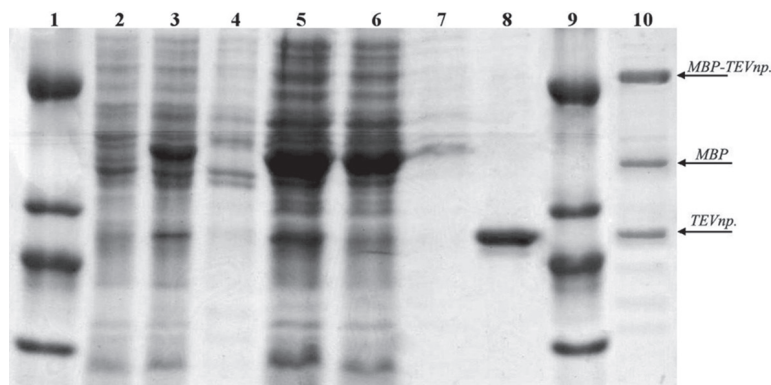


Рис. 1. Фрагмент электрофореграммы белковых образцов на различных стадиях получения TEV-протеазы

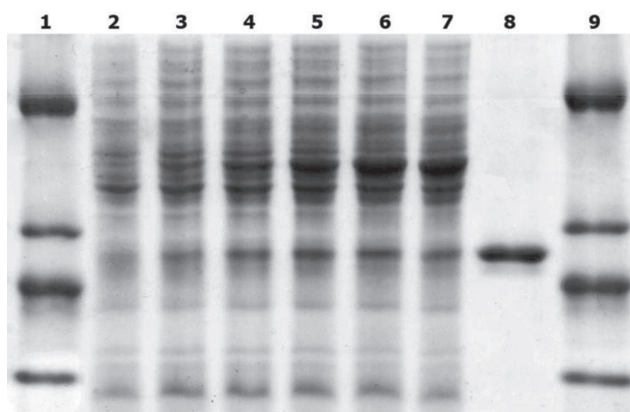


Рис. 2. Фрагмент электрофореграммы лизатов клеток-продуцентов TEV-протеазы, инкубированных с индуктором различное время

Изучение зависимости уровня синтеза фермента от времени инкубации клеток (температура 30 °С) показало, что максимальный уровень экспрессии наблюдается уже через 4 ч (рис. 2, дор. 6), дальнейшая инкубация не приводила к увеличению количества продукта.

Полученные результаты (50 мг/л) в целом совпадают с данными работы [7] для мутанта A26 (54 мг/л), содержащего три аминокислотные замены: T17S, N68D и I77V. Мы предполагали, что наши результаты будут более высокими в сравнении с данными [7], вероятно, отличия объясняются различными экспрессирующими системами, поэтому сравнение результатов является не совсем корректным. Так в работе [7] использовался вектор с промотором T7, в нашем случае – T5, а в качестве хозяйского штамма авторы использовали клетки Rosseta(DE3) pLysS, которые синтезируют редкие для *E. coli* транспортные РНК. Кроме того, авторы в своей работе [7] инкубировали клетки в течение ночи при 20 °С, в нашем же случае

инкубация выполнялась 4 часа при 30 °С. Таким образом, достоинством нашей системы можно считать, что аналогичный выход продукта достигался за сравнительно меньший промежуток времени.

Дорожки: 1, 9 – маркерные белки (бычий сывороточный альбумин 66 кДа, рекомбинантный апоА-I 33,5 кДа [1], нативный апоА-I 27 кДа [1], лизоцим 14,5 кДа); 2-7 – лизаты клеток инкубированных с добавлением индуктора в течение 15, 30, 60 мин, 2, 4 и 6 ч соответственно; 8 – очищенный фермент TEV-протеаза.

Мы попытались воспроизвести условия инкубации клеток аналогично работе [7] – снизили температуру инкубации до 20 °С, инкубацию проводили в течение ночи (~ 20 часов). Однако в результате такого эксперимента, после выделения фермента, в препарате присутствовал полноразмерный полипептид MBP-TEV-протеаза (рис. 1, дор. 10), судя по электрофореграмме, примерно половина полипептида осталась нерасщепленным. Вероятно, это связа-

но с тем, что оптимальная температура для проявления ферментативной активности TEV-протеазы составляет 34 °C [5] и при понижении до 20 °C активность фермента существенно падает, настолько, что в этих условиях полипептид не успевает полностью проводить реакцию саморасщепления. Таким образом, оптимальными условиями для получения фермента в полученных клетках-продуцентах при концентрации индуктора 0,5 мМ являлись: температура инкубации – 30 °C, время инкубации – 4 ч.

#### Заключение

В результате выполненной работы на основе клеток *E. coli* шт. BL21(DE3) был получен продуцент рекомбинантного фермента – протеазы вируса табачной мозаики, с выходом белка ~ 50 мг/л. Данный результат был достигнут за счет оптимизации кодонов гена TEV-протеазы для экспрессии в клетках *E. coli*, слиянием фермента с мальтозо-связывающим белком, и заменой четырех аминокислот (S219V, T17S, N68D и I77V). Оптимальными условиями культивирования клеток-продуцентов были

найжены следующие: выращивание клеток до логарифмической фазы роста, добавление индуктора до 0,5 мМ и последующая инкубация клеток 4 ч при 30 °C.

#### Список литературы

1. Рябченко А.В., Котова М.В., Твердохлеб Н.В., Князев Р.А., Поляков Л.М. // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2015. – № 3. – С. 155–159.
2. Kapust R.B., Tozser J., Fox J.D., Anderson D.E., Cherry S., Copeland T.D., and Waugh D.S. // Prot. Eng. – 2001. – V. 14, № 12. – P. 993–1000.
3. Kapust R.B., Waugh D.S. Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused // Protein Sci. – 1999. – V. 8, № 8. – P. 1668–1674.
4. Lucast L. J., Batey R. T., Doudna J. A. Large-scale purification of a stable form of recombinant tobacco etch virus protease // Biotechniques. – 2001. – V. 30, № 3. – P. 544–546.
5. Nallamsetty, S., Kapust, R.B., Tözsér, J., Cherry, S., Tropea, J.E., Copeland, T.D., and Waugh, D.S. // Protein Expr. Purif. – 2004. – V. 38, № 1. – P. 108–115.
6. Tropea J.E., Cherry S., Waugh D. S. Expression and purification of soluble his6-tagged TEV protease // Methods in Molecular Biology: High Throughput Protein Expression and Purification. – 2009. – V. 498. – P. 297–307.
7. Van den Berg S., Lofdahl P., Hard T., Berglund H. Improved solubility of TEV protease by directed evolution // Journal of Biotechnology. – 2006. – V. 121, № 3. – P. 291–298.