



УДК 577.113.6:579(252.5+253.4).083

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ТИОРЕДОКСИНА *Escherichia coli*

© 1995 г. М. Г. Баренбойм, Л. Н. Шингарова, В. Г. Коробко*

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 26.08.94 г.

С помощью полимеразной цепной реакции из хромосомы *E. coli* выделен ген тиоредоксина (*trxA*). Сконструированы рекомбинантные плазмиды с синтетическим участком инициации трансляции для экспрессии гена *trxA* под контролем регулируемого *tac*-промотора или тандема конститутивных промоторов А2 и А3 бактериофага Т7. Полученные конструкции обеспечивают высокий уровень биосинтеза тиоредоксина в клетках бактерий.

Ключевые слова: тиоредоксин, экспрессия в *E. coli*, полимеразная цепная реакция.

Тиоредоксин – небольшой полифункциональный белок (M 12 кДа), присутствующий практически во всех прокариотических и эукариотических организмах. Полагают, что одна из основных функций этого белка заключается в поддержании окислительного потенциала клетки, необходимого для образования дисульфидных связей и восстановления их в тиольные группы [1]. Тиоредоксин требуется для репликации ДНК фага Т7, так как является необходимой субъединицей фаговой ДНК-полимеразы [2, 3]. Подобно вспомогательным белкам 44/62 и 45 ДНК-полимеразы бактериофага Т4 и дополнительному белку ДНК-полимеразы III *E. coli* [4] тиоредоксин повышает процессивность Т7-ДНК-полимеразы на три порядка за счет увеличения стабильности комплекса ДНК-праймер [5, 6]. Помимо этого тиоредоксин необходим для роста нитчатых фагов; фаги f1 и M13 теряют способность размножаться на клетках *E. coli*, мутантных по гену тиоредоксина (*trxA*) [7]. Было также показано *in vitro*, что тиоредоксин может облегчать образование нативных дисульфидных связей при свертывании рибонуклеазы с неправильным расположением дисульфидных связей [8]. Это свойство открывает перспективы использования тиоредоксина в генотехнике для предотвращения образования нерастворимых белковых агрегатов при экспрессии гетерологичных генов в *E. coli* [9].

В связи с этим представлялось целесообразным осуществить клонирование гена тиоредокси-

на и сконструировать плазмиды, обеспечивающие конститутивную или регулируемую экспрессию этого гена. Решение поставленной задачи в значительной степени облегчалось тем, что нуклеотидная последовательность гена *trx* была определена ранее [10 - 12]. Поэтому для его получения использовали PCR в присутствии ДНК-полимеразы из термофильной бактерии *Thermus aquaticus* на хромосомной ДНК *E. coli* штамма HB101 в качестве матрицы. С этой целью были синтезированы 30-звенные олигонуклеотиды-праймеры AGGATATCGATATGAGCGATAAAATTATT (*trx1*) и ATCGATAAGCTTTTACGCCAGGTTAGCGTC (*trx2*). Олигонуклеотид *trx1* соответствует последовательности 5'-конца гена тиоредоксина и содержит непосредственно перед АТГ-кодоном сайт узнавания рестриктазы *ClaI*, тогда как олигонуклеотид *trx2* комплементарен 3'-концу гена и содержит за терминирующим кодоном последовательность узнавания эндонуклеазы *HindIII*. В результате реакции амплификации с этими праймерами (условия – см. “Экспериментальную часть”) был получен фрагмент ДНК длиной 354 п. о. Этот фрагмент после очистки электрофорезом в 1.5% геле агарозы обработали избытком рестриктазы *HindIII* и эндонуклеазой *ClaI* в условиях частичного гидролиза (5 мин при 37°C, 0.5 ед. активности фермента на 1 мкг фрагмента), поскольку ген *trxA* *E. coli* содержит сайт узнавания рестриктазы *ClaI*. Перед клонированием в экспрессионный вектор фрагмент ДНК величиной 334 п. о., содержащий кодирующую последовательность гена тиоредоксина, отделяли от продуктов полного гидролиза электрофорезом в 1.5% агарозном геле.

На первом этапе в качестве вектора для индуцибельной экспрессии амплифицированного гена

Использованные сокращения: РСЯ – полимеразная цепная реакция, IPTG – изопропилтио-β-D-галактопиранозид; префикс “d” в обозначении олигодезоксирибонуклеотидов для краткости опущен.

* Автор для переписки.

использовали плазмиду рКК223-3. С этой целью плазмиду расщепили рестриктазами *EcoRI* и *HindIII* и полученный вектор лигировали с *Clal/HindIII*-фрагментом, содержащим ген тиоредоксина, в присутствии 10-кратного избытка синтетического дуплекса, содержащего участок инициации трансляции:

(5') AATTCGGTACСТААТТТААТТТААГГАТТААТ
 (3') GCCATGGATТАААТТАААТТССТААТТАГС
 дуплекс А
 (подчеркнута последовательность Шайна-Далгарно)

Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* XL1 и полученные клоны анализировали на наличие в плазмидных ДНК *KpnI/HindIII*-фрагмента величиной около 360 п. о. В результате получили плазмиду РКК-*trx*, в которой ген тиоредоксина помещен под контроль регулируемого *tac*-промотора и синтетического участка связывания рибосомы (рис. 1). Строение плазмиды РКК-*trx* подтверждали рестриктным анализом с помощью эндонуклеаз *BsuRI* и *Cfr13I* и определением нуклеотидной последовательности ее *KpnI/HindIII*-фрагмента методом дидезокситерминаторов с использованием ДНК-полимеразы фага Т7 и праймеров *trx1* и *trx2*.

При конструировании плазмиды для нерегулируемой экспрессии гена тиоредоксина в качестве вектора была использована плазида р6А23 [13], содержащая тандем ранних промоторов бактериофага Т7. Клонирование гена тиоредоксина в эту плазмиду проводили простой рекомбинацией *in vitro* между плазмидами РКК-*trx* и р6А23 по сайтам *KpnI* и *HindIII*. В результате получили плазмиду р6А23-*trx*, экспрессия гена тиоредоксина в которой детерминирована промоторами А2 и А3 и тем же участком инициации трансляции, что в плазмиде РКК-*trx* (рис. 1).

Для исследования экспрессии клонированного гена тиоредоксина плазмидой р6А23-*trx* трансформировали компетентные клетки *E. coli* SG20050 для конститутивной экспрессии и плазмидой РКК-*trx* клетки штамма JM109 для регулируемой экспрессии. В первом случае клетки анализировали на содержание рекомбинантного белка после роста в течение 16 ч. Во втором случае к бульону добавляли 1/100 часть ночной культуры клеток *E. coli* JM109 с плазмидой РКК-*trx*, выращивали до мутности 0.8 и затем проводили индукцию промотора, добавляя IPTG до концентрации 2 мМ. Пробы отбирали через 2.5 и 16 ч после начала индукции. Уровень биосинтеза белка контролировали электрофорезом в 13% SDS-ПААГ (рис. 2). Оказалось, что обе плазмидные конструкции обеспечивают в клетках бактерий высокий уровень биосинтеза белка с молекулярной массой около 12.0 кДа, причем в клетках с плазмидой РКК-*trx* экспрессия строго регулируется.

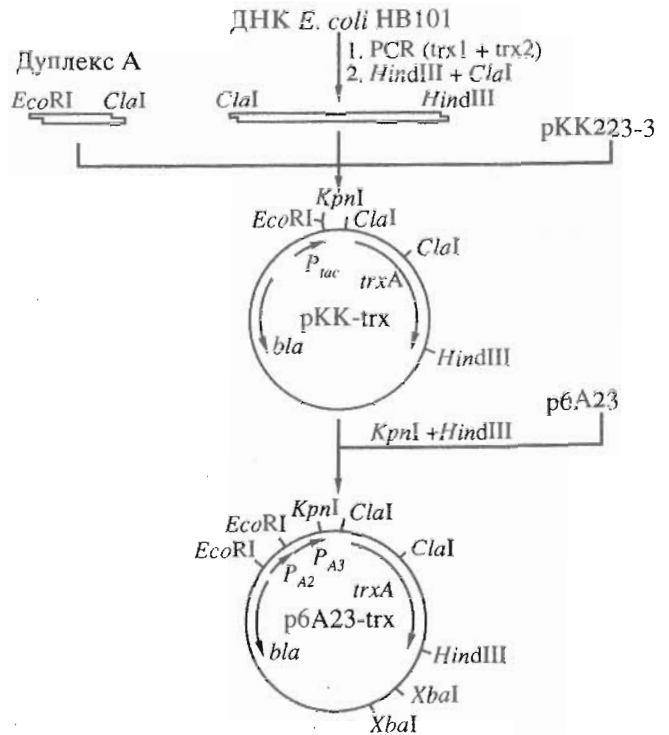


Рис. 1. Схема конструирования плазмид РКК-*trx* и р6А23-*trx*.

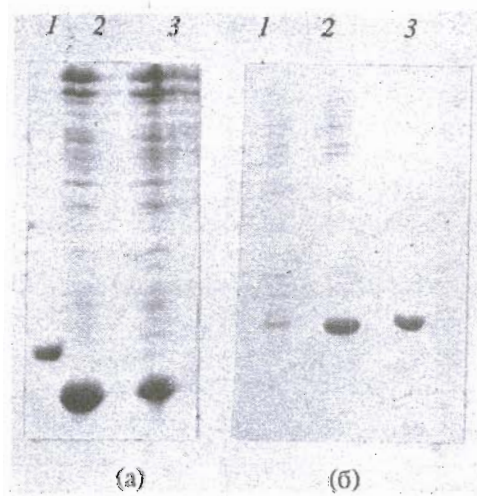


Рис. 2. Анализ суммарных клеточных белков при помощи электрофореза в 13% SDS-ПААГ. а: 1 - маркер (лизоцим, *M* 14 кДа); 2 и 3 - лизат клеток *E. coli* JM109 с плазмидой РКК-*trx* после индукции IPTG через 16 и 2.5 ч соответственно; б: лизат клеток *E. coli* SG20050 без плазмиды (1) и с плазмидой р6А23-*trx* (2); изолированный тиоредоксин (3).

На заключительном этапе работы выделяли рекомбинантный белок из 200 мл индуцированной клеточной культуры при помощи ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе DE-52 с последующей гель-фильтрацией на сефадексе G-50 как описано в работе [14]. В результате выделено

более 50 мг индивидуального белка (чистота >95% по данным SDS-ПААГ). Для изолированного белка проведен анализ N-концевой аминокислотной последовательности. Определенная последовательность первых шести аминокислотных остатков (SerAspLysIleIleHis) совпала с опубликованной [11].

Таким образом, осуществлено клонирование гена тиоредоксина *E. coli*, а также созданы рекомбинантные штаммы, эффективно экспрессирующие тиоредоксин.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали следующие реактивы и ферменты: акриламид; трис-гидроксиэтилметанолметан (трис), бисакриламид (Merck, Германия); агарозу, этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA), дитиотреит, IPTG (Sigma, США); триптон, дрожжевой экстракт (Difco, Англия); додецилсульфат натрия (SDS), N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, глицин (Reanal, Венгрия); легкоплавкую агарозу (FMC, США), эндонуклеазы рестрикции *Hind*III, *Cla*I, *Nco*I производства НПО "Биопол" (г. Москва); *Pst*I, *Cla*I, *Bsu*RI, *Cfr*13I, *Eco*RI, а также ДНК-полимеразу из *T. aquaticus* и ДНК-полимеразу из фага T7 производства НПО "Фермент" (г. Вильнюс). ДНК-лигаза фага T4 (60 ед. акт./мкл) выделена в лаборатории химии генов ИБХ РАН.

В работе использовались следующие штаммы *Escherichia coli*: 1) XL1-Blue *recA*⁻ (*recA*1, *lac*⁻, *endA*1, *gyrA*96, *thi*, *hsdR*17, *supE*44, *relA*1, {F' *proA*⁺*B*⁺, *lacI*^q, *lacZ*ΔM15, Tn10}) – разработан фирмой Stratagene (США); 2) SG 20050 *recA*⁺ (F⁻, *araD*139, Δ(*argF-lac*)U169, *flbB*5301, *deoC*1, *rpsL*150, *relA*1, Δlon-100, *cps-50::Mu dI*) [15]; 3) HB101 *recA*⁻ (F⁻, *hsdS*20(*r_B*⁻, *m_B*⁻), *recA*13, *ara*-14, *proA*2, *lacY*1, *galK*2, *rpsL*20 (Sm^r), *xyl*-5, *mtl*-1, *SupE*44, λ⁻) [16]; 4) JM109 *recA*⁻ (*recA*1, *endA*1, *gyrA*96, *hsdR*17, *relA*1, Δ(*lac-proAB*), *thi*1, *supE*44, {F' *traD*36, *proAB*, *lacI*^qΔM15}) [16].

Выделение ДНК *E. coli* HB101 приводили так, как описано в работе [16]. Плазмидную ДНК выделяли методом Бирнбойма и Доли [17]. В работе использованы стандартные питательные среды LB [16]. Приготовление компетентных клеток *E. coli* и трансформацию проводили так же, как в работе [16].

Электрофорез белков осуществляли по методу Лэммли [18] в 13% полиакриламидном геле.

Аmplификацию гена тиоредоксина проводили в 100 мкл раствора, содержащего 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄, 67 мМ трис-НСl (рН 7.5), 1.5 мМ MgCl₂, 100 мМ 2-меркаптоэтанол, 6.7 мкМ EDTA, по 50 пмоль каждого праймера, dNTP (100 мкМ каждый), 10 нг матрицы, 2 ед. акт. ДНК-полимеразы

T. aquaticus. Амплификацию (30 циклов) проводили на приборе фирмы Perkin-Elmer Cetus (США). Каждый цикл состоял из денатурации матрицы (94°C, 90 с), отжига олигонуклеотидов (37°C, 2 мин) и достройки цепей ДНК (72°C, 2 мин). Продукты реакции выделяли при помощи электрофореза в геле легкоплавкой агарозы, как описано в работе [16].

Лигирование фрагментов ДНК проводили в объеме 50 мкл при помощи ДНК-лигазы фага T4 в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl (рН 7.5), 10 мМ MgCl₂, 5 мМ DTT. Реакционная смесь обычно содержала 0.1 - 0.2 мкг линейризованного вектора, избыток клонируемого фрагмента ДНК, 1 мМ gATP и 20 ед. акт. ДНК-лигазы. Реакцию проводили 6 ч при 12°C и останавливали прогреванием при 70°C в течение 10 мин, после чего использовали для трансформации компетентных клеток.

Для анализа экспрессии гена *trx* в плазмиде рКК-*trx* 100 мкл ночной культуры клеток, выращенной на LB-бульоне, содержащем 50 мкг/мл ампициллина и 0.2% глюкозы, разбавляли 10 мл той же питательной среды и растили при 37°C до мутности A₆₀₀ 0.8. Затем клетки центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин, осадок промывали 5 мл бульона LB, снова центрифугировали, суспендировали в 10 мл среды LB, содержащей 50 мкг/мл ампициллина, и добавляли IPTG до концентрации 2 мМ. Культуру выращивали при 37°C, отбирая пробы через 2.5 и 16 ч.

Выделение белка проводили при помощи хроматографии на DEAE-целлюлозе DE-52 и сефадексе G-50, как описано в работе [14].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Holmgren A. // Ann. Rev. Biochem. 1984. V. 54. P. 237 - 271.
- Mark D.F., Richardson C.C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1976. V. 73. № 3. P. 780 - 784.
- Modrich P., Richardson C.C. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 14. P. 5508 - 5514.
- Nossal D.N. // Ann. Rev. Biochem. 1983. V. 53. P. 581 - 615.
- Tabor S., Huber H.E., Richardson C.C. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. № 33. P. 16212 - 16223.
- Huber H.E., Tabor S., Richardson C.C. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. № 33. P. 16224 - 16332.
- Russel M., Model P. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 32. P. 14997 - 15005.
- Pigiet V.P., Schuster B. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 20. P. 7643 - 7647.
- Lavallie E.R., Diblasio E.A., Kovacic S., Grant K.L., Schendel P.F., McCoy J.M. // Bio-Technology. 1993. V. 11. № 2. P. 187 - 193.
- Wallace B.J., Kushner S.R. // Gene. 1984. V. 32. № 3. P. 399 - 408.

11. Hoog J.-O., Von Bahr-Lindstrom H., Josephson S., Wallace B.J., Kushner S.R., Jornvall H., Holmgren A. // *Bio-sci. Rep.* 1984. V. 4. № 11. P. 917 - 923.
12. Lim C.-J., Geraghty D., Fuchs J.A. // *J. Bacteriol.* 1985. V. 163. № 1. P. 311 - 316.
13. Коробко В.Г., Болдырева Е.Ф., Некрасова О.В., Микельский А.В., Филиппов С.А., Добрынин В.Н. // *Биоорган. химия.* 1991. Т. 17. № 4. С. 461 - 469.
14. Lunn C.A., Kathju S., Wallace B.J., Kushner S.R., Pigiet V. // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. № 16. P. 10469 - 10474.
15. Мазин А.В., Кузнецов К.Д., Краев А.С. *Методы молекулярной генетики и геной инженерии.* Новосибирск: Наука, 1990.
16. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. *Молекулярное клонирование.* М.: Мир, 1984. С. 479.
17. Birnboim H.C., Doly J. // *Nucl. Acids Res.* 1979. V. 7. № 6. P. 1513 - 1523.
18. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680 - 685.

Cloning and Highly Efficient Expression of the Gene Encoding *Escherichia coli* Thioredoxin

M. G. Barenboim, L. N. Shingarova, and V. G. Korobko*

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117871 Russia

Abstract – The gene encoding thioredoxin (*trxA*) was isolated from chromosomal DNA of *E. coli* HB101 strain using the polymerase chain reaction. The cloned structural gene with a synthetic Shine-Dalgarno sequence was placed under the control of either inducible *tac*-promoter or a tandem of two strong constitutive promoters A2 and A3 from early region of bacteriophage T7. Both constructions were shown to provide high levels of biosynthesis of recombinant thioredoxin.

Key words: thioredoxin, expression in *E. coli*, polymerase chain reaction.

* To whom correspondence should be addressed.