

ВЕСЦІ НАЦЫЯНАЛЬНАЙ АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ № 2 2016
СЕРЫЯ ХІМІЧНЫХ НАВУК

УДК 577.17.083:175.322

А. М. ГОРЬКАВАЯ, Г. В. СЕРГЕЕВ, А. А. ГИЛЕП

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ, ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ
И ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО СОМАТОТРОПИНА *GALLUS GALLUS*

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: annagorkavaya@gmail.com, gvserg@iboch.bas-net.by, agilep@iboch.bas-net.by

Соматотропины относятся к группе полипептидных гормонов, запускающих различные каскады биохимических процессов. Основная функция соматотропина – влияние на анаболические и катаболические процессы организма, а также иммуномодулирующая функция. В представленной работе проведено молекулярное клонирование, гетерологическая экспрессия и очистка рекомбинантного соматотропина *Gallus gallus*. Созданы две технологические схемы получения соматотропина: бактериальная экспрессия с последующей солюбилизацией телец включения и периплазматическая экспрессия соматотропина в бактериальных клетках. Выход целевого гормона составил 2,43 и 15 мг белка на литр культуральной среды соответственно. В работе показано, что наиболее оптимальной является стратегия периплазматической экспрессии, при которой нет необходимости в сложных процедурах солюбилизации и рефолдинга и получаемый белковый продукт характеризуется более высоким выходом и степенью очистки.

Ключевые слова: соматотропин, рекомбинантный белок, бактериальная экспрессия, периплазматическая экспрессия, *E. coli*, *G. gallus*.

А. М. GORKAVAYA, G. V. SERGEEV, A. A. GILEP

MOLECULAR CLONING, HETEROLOGICAL EXPRESSION AND PRODUCTION
OF THE RECOMBINANT *G. GALLUS* GROWTH HORMONE

Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: annagorkavaya@gmail.com, gvserg@iboch.bas-net.by, agilep@iboch.bas-net.by

Growth hormones (GH) are polypeptides that trigger different biochemical pathways. GH main function is to regulate anabolic and catabolic processes. GH also plays an important role as immunomodulator. In this paper, molecular cloning, heterological expression and purification of the recombinant *G. gallus* growth hormone have been conducted. Two biotechnological schemes have been developed: cytosol expression followed by inclusion bodies solubilisation and periplasmatic secretion. Expression levels of 2.43 and 15 mg per 1 liter of bacterial culture respectively were achieved. It has been shown that the best way of expression is periplasmatic secretion, which does not require complex solubilisation and refolding procedures and results in higher product yield and purity.

Keywords: growth hormone, recombinant protein, bacterial expression, periplasmatic secretion, *E. coli*, *G. gallus*.

Введение. У высших позвоночных ген, кодирующий гормон роста, состоит из пяти экзонов и четырех интронов. В результате альтернативного сплайсинга образуется большое разнообразие мРНК, кодирующих различные изоформы гормона роста. Молекулярная масса полноразмерного соматотропина составляет около 22 кДа [1]. К настоящему времени охарактеризованы гормоны роста нескольких видов птиц, в том числе и *Gallus gallus* (*G. gallus*) (молекулярная масса соматотропина – 23 кДа) [2].

Значительный интерес для биотехнологии представляют препараты, способствующие увеличению продуктивности и эффективности сельского хозяйства. Очищенный соматотропин оказывает эффективное воздействие на организмы животных – способствует росту и увеличению мышечной массы.

В настоящее время широко используются методы синтеза эукариотических белков в бактериальных клетках. При экспрессии в клетках *Escherichia coli* (*E. coli*) без сигнальной последовательности и под регуляцией сильного промотора целевой белок часто синтезируется в виде телец включения. Тельца включения содержат рекомбинантный белок в денатурированной форме. Для получения активной формы белка необходимо использование трудоемкой и длительной процедуры рефолдинга [3–8]. Обычно процедура рефолдинга включает в себя две последовательные стадии. Первая – растворение телец включения при помощи высоких концентраций хаотропных солибилизирующих агентов, таких как мочевины и гуанидин гидрохлорид. Вторая – постепенное удаление хаотропного агента, позволяющее обеспечить корректный рефолдинг белка.

Для облегчения процедуры выделения рекомбинантных белков используются разные подходы. Так, при добавлении бактериального сигнального пептида к N-концевой последовательности, рекомбинантные белки могут проходить через мембрану и накапливаться в периплазматическом пространстве клеток *E. coli* в нативной форме. При этом после транспортировки белка в периплазму сигнальный пептид отщепляется лидерной пептидазой, локализованной во внутренней мембране клетки [9,10]. Существует ряд преимуществ периплазматической экспрессии рекомбинантных ферментов: белок синтезируется в активной форме и его накопление происходит в периплазме, что позволяет облегчить его последующие выделение и очистку. Дисульфидные оксидоредуктазы и изомеразы, локализованные в периплазме *E. coli*, катализируют формирование дисульфидных мостиков, обеспечивая накопление нативных и растворимых белковых продуктов и делая периплазматическую экспрессию идеальным способом для получения ряда терапевтических белков, в том числе гормонов роста [11–14].

Материалы и методы исследования. Реагенты. Были использованы реактивы следующих фирм-производителей: ТВ среда (Fluka, США); канамицин (Km), ампицилин (Amp), IPTG, глицин, гистидин, мочевины, бромфеноловый синий, β -меркаптоэтанол и BSA (Sigma, США); Tris Base, 0,4 мМ фенолметилсульфонилфторид (ФМСФ, PMSF), 0,3 М NaCl и глицерин (Acros organics, Германия); Ni-NTA агароза (Qiagen, США); SDS (sodium dodecyl sulfate), акриламид, TEMED и персульфат аммония (USB, США); рестриктаза *NdeI*, рестриктаза *VamHI*, 10X Tango Buffer, T4 ДНК лигаза и термочувствительная щелочная фосфатаза (Fermentas, Литва).

Гетерологическая экспрессия соматотропина в клетках *E. coli*. Выделение и очистка белка путем солибилизации из телец включения. Ночную культуру клеток *E. coli* BL21 (*DE3*) разводили 1:200 ТВ-средой, содержащей 100 мкг/мл Amp, и инкубировали в течение 4,5 ч при температуре 37 °С и интенсивности перемешивания 180 rpm. Индукцию белкового синтеза осуществляли добавлением IPTG до конечной концентрации 0,5 мМ. Экспрессию белка осуществляли 48 ч при интенсивности перемешивания 140 rpm и температуре 37 °С.

После проведения экспрессии клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 10 мМ Трис-HCl буфере (pH 8,0), содержащем 0,4 мМ ФМСФ, 0,3 М NaCl, 20% глицерин. Хранение осуществляли при температуре минус 20 °С. Для выделения целевого белка клетки размораживали и разрушали на гомогенизаторе EmulsiFlexC3. Далее проводили осаждение центрифугированием (5000 rpm 10 мин) и осадок ресуспендировали в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl (pH 12,0), 0,4 мМ ФМСФ, 0,3 М NaCl и 2М мочевины. Перемешивали в течение 20 ч. Раствор центрифугировали при 18000 rpm в течение 60 мин. Супернатант разводили буфером, содержащим 50 мМ Трис-HCl (pH 12,0), 0,4 мМ ФМСФ, 0,3 М NaCl в 10 раз и инкубировали 12 ч, чтобы способствовать корректному рефолдингу белка.

Раствор белка наносили на Ni-NTA агарозу (1,5×10 см), предварительно уравновешенную буфером, содержащим 50 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 0,3 М NaCl. После нанесения колонку промывали буфером, содержащим 50 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 0,3 М NaCl и 100мМ глицин. Элюцию белка с колонки осуществляли 50 мМ Трис-HCl буфером (pH 8,0), содержащим 0,3М NaCl и 400 мМ имидазол. Контроль чистоты полученных белковых препаратов осуществляли с помощью гелеэлектрофореза в 15%-ном ПААГ в присутствии Ds-Na методом Laemmli на приборе Mini Protean II («Bio-Rad», США).

Конструирование экспрессионного вектора для периплазматической экспрессии соматотропина в клетках *E. coli*. Из клеток *E. coli*, содержащих плазмиду pT7_str_ch со вставкой кДНК, кодирующей соматотропин, была выделена плазмидная ДНК (концентрацию измеряли спектрофотометрически на приборе NanoDrop2000). Для устранения добавочного сайта рестрикции *BamHI* в плазмиде pT7_str_ch, проводили сайт-направленный мутагенез с использованием амплификатора Step One Real-time PCR system (Applied Biosystems). Полученной плазмидой pT7_str_ch, не содержащей дополнительного сайта рестрикции *BamHI*, трансформировали клетки *E. coli* (*DH5α*).

Модифицированный таким образом вектор pT7 и вектор, содержащий синтетическую конструкцию (сигнальный пептид PelB и N-концевой участок соматотропного гормона), подвергали рестрикции по сайтам *NdeI*/*BamHI* с последующим перекрестным лигированием при помощи T4 ДНК лигазы (модифицированный вектор перед лигированием был обработан щелочной фосфатазой). Полученной готовой конструкцией трансформировали клетки *E. coli* (*DH5α* и *BL21*). Нуклеотидная последовательность полученной плазмидной конструкции была проверена при помощи секвенирования. Постановку реакции секвенирования осуществляли, используя набор BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Секвенирование каждого образца проводили с прямым и обратным праймерами. Очистку сиквенс-продуктов проводили, используя набор Applied Biosystems BigDye XTerminator Purification Kit, а анализ – на приборе Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (POP7 polymer, capillary length 36 cm).

Периплазматическая экспрессия соматотропина в клетках *E. coli*. Ночную культуру клеток *E. coli* *BL21* (*DE3*) разводили 1:200 ТВ-средой, содержащей 100 мкг/мл Amp, и инкубировали в течение 4,5 ч при температуре 37 °С и интенсивности перемешивания 180 rpm. Индукцию белкового синтеза осуществляли добавлением IPTG до конечной концентрации 0,5 мМ. Экспрессию осуществляли 24 ч при температуре 30 °С и интенсивности перемешивания 140 rpm. Целевой белок выделяли из периплазмы, затем очищали на колонке с Ni-NTA агарозой. Промывку колонки осуществляли буфером, содержащим 50 мМ Трис-НСI (рН 8,0), 0,3 М NaCl и 100мМ глицин, а элюцию белка с колонки – 50 мМ Трис-НСI буфером (рН 8,0), содержащим 0,3М NaCl и 400 мМ имидазол.

Анализ молекулярной массы белков методом масс-спектрометрии осуществляли на настольном MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex LRF system («Bruker Daltonik GmbH», Германия).

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ данных секвенирования показал, что аминокислотная последовательность кодируемого белка соответствует последовательности соматотропина *G. gallus*. При этом кодоны, которые не характерны для бактериального генома, были заменены на кодоны, тРНК которых широко представлены в транскрипционном аппарате бактериальной клетки.

Выделение соматотропного гормона с использованием телец включения. В ходе исследования нами были подобраны оптимальные условия для экспрессии, выделения целевого белка и солюбилизации телец включения. Для этого были применены различные комбинации солюбилизирующих агентов и времени солюбилизации. Отобранные на различных этапах выделения пробы анализировали методами ПААГ-электрофореза (рис. 1) и масс-спектрометрии. Мы пришли к выводу, что оптимальными условиями для экспрессии, выделения целевого белка являются: синтез белка при 37 °С в течение 48 ч с последующей солюбилизацией телец включения в 2М мочеvine при высоком значении рН (рН 12,0).

Воздействие на тельца включения комбинации подобранных условий (рН 12,0 и 2М мочеvine) привело к наибольшей их солюбилизации по сравнению с другими использованными условиями. Был получен целевой белковый продукт высокой степени очистки. Общее количество выделенного рекомбинантного соматотропина (*G. gallus*) составило 2,43 мг на литр культуральной среды.

С целью повышения выхода целевого продукта, улучшения его качества, облегчения очистки и выделения был использован альтернативный подход к осуществлению экспрессии – периплазматическая экспрессия и разработана векторная конструкция для ее осуществления в клетках *E. coli*.

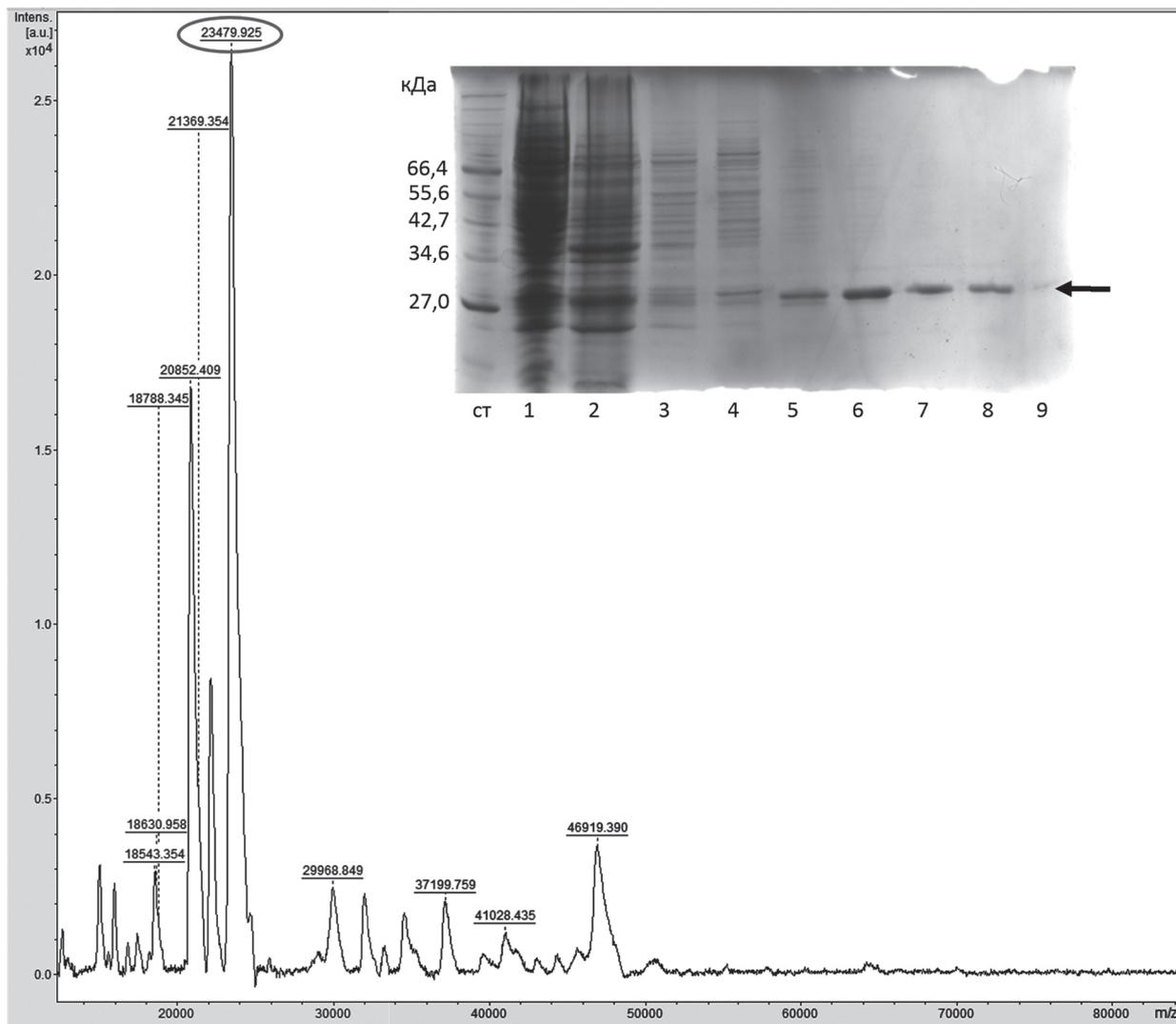


Рис. 1. Масс-спектр рекомбинантного соматотропина *G. gallus*. На вставке приведены результаты электрофореза в 15% ПААГ (в присутствии SDS). Ст – маркер молекулярных масс; 1 – супернатант после центрифугирования (до солюбилизации); 2 – осадок после центрифугирования (до солюбилизации); 3 – супернатант после солюбилизации; 4 – фракция, собранная при промывке колонки; 5–9 – фракции, собранные при элюции. Стрелкой указан целевой белок

Для этого была получена синтетическая нуклеотидная конструкция, состоящая из последовательности, кодирующей сигнальный пептид PelB и N-концевой участок соматотропного гормона. В 5'-конец последовательности был введен сайт для рестриктазы *NdeI*, а на 3'-конец – сайт для рестриктазы *BamHI*. С помощью данной конструкции был модифицирован вектор pT7 со вставкой, кодирующей кДНК активной формы соматотропина, способный экспрессироваться в *E. coli*. Вектор и синтетический фрагмент после рестрикции по *NdeI/BamHI* и последующего лигирования образуют конструкцию (рис. 2), позволяющую синтезировать полипептид, содержащий в своем составе зрелую форму соматотропного гормона с лидерной последовательностью PelB в N-концевой последовательности. Данный полипептид в клетках *E. coli* транспортируется в периплазматическое пространство, где происходит отщепление лидерного сигнала и корректная сборка зрелого белка. Это позволяет избежать синтеза белка в тельца включения, использования мочевины в ходе выделения и не всегда успешной процедуры рефолдинга целевого белка.

Так как вектор pT7 содержит дополнительный сайт рестрикции *BamHI* (помимо целевого), перед началом работы с рестриктазами его необходимо было устранить. Для этого использовался метод сайт-направленного мутагенеза. Полученные плазмиды были проанализированы методом электрофореза в агарозном геле с последующим выделением из геля и трансформацией

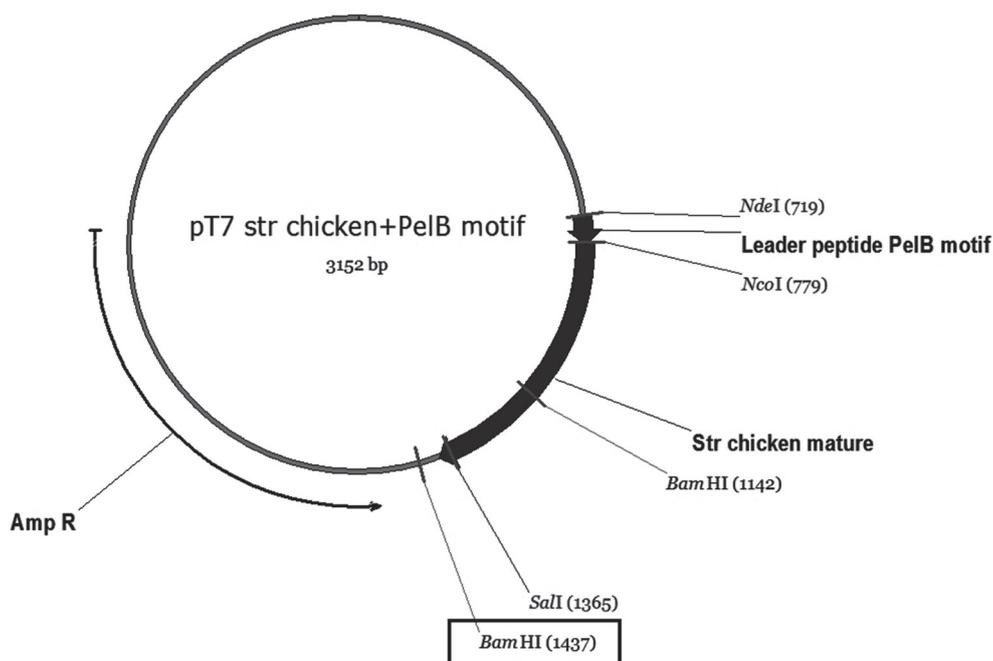


Рис. 2. Векторная конструкция для периплазматической экспрессии рекомбинантного соматотропина (*G. gallus*), удаляемый сайт рестрикции выделен рамкой

ими клеток *E. coli DH5α*. После пересева и наработки трансформантов из них была выделена искомая плаزمида рТ7-сhGH со вставкой, кодирующей кДНК активной формы соматотропина и не содержащей дополнительного сайта рестрикции *BamHI*.

Далее была проведена рестрикция *NdeI/BamHI* модифицированного вектора рТ7 и вектора, содержащего синтетическую конструкцию, с последующим анализом методом электрофореза в агарозном геле. Из геля были выделены только необходимые фрагменты вектора и вставки.

Вектор был обработан щелочной фосфатазой для предотвращения лигирования без участия вставки. Затем было произведено лигирование с последующей трансформацией клеток *E. coli*. Были получены клоны *E. coli* штаммов *DH5α* и *BL21*, содержащие плазмиду рТ7-сhGHPelB со вставкой, кодирующей кДНК активной формы соматотропина и сигнальный пептид PelB.

Нуклеотидная последовательность полученной плазмидной конструкции была подтверждена секвенированием.

Далее была проведена бактериальная экспрессия (24ч, 30°C) с последующим выделением периплазматических белков и очисткой целевого продукта на колонке с Ni-NTA агарозой. Анализ полученных фракций проводился методом ПААГ-электрофореза (рис. 3).

Общее количество выделенного рекомбинантного соматотропина (*G. gallus*) составило 15 мг на литр культуральной среды. Полученный данным способом белок также содержит меньше примесей, чем при выделении с последующей солюбилизацией телец включения. Для удобства хранения и дальнейших исследований препарат был переведен в лиофилизированную форму.

Заключение. В результате проведенного исследования подобраны оптимальные условия для бактериальной экспрессии способы выделения белкового препарата рекомбинантного соматотропина (*G. gallus*) и разработана векторная конструкция для периплазматической экспрессии рекомбинантного соматотропина (*G. gallus*) в клетках *E. coli*.

Получен препарат целевого белка в лиофилизированной форме.

Общее количество рекомбинантного соматотропина (*G. gallus*), выделенного при помощи бактериальной экспрессии с последующей солюбилизацией телец включения, составило 2,43 мг на литр культуральной среды. Общее количество рекомбинантного соматотропина (*G. gallus*), выделенного при помощи периплазматической экспрессии, составило 15 мг на литр культуральной среды.

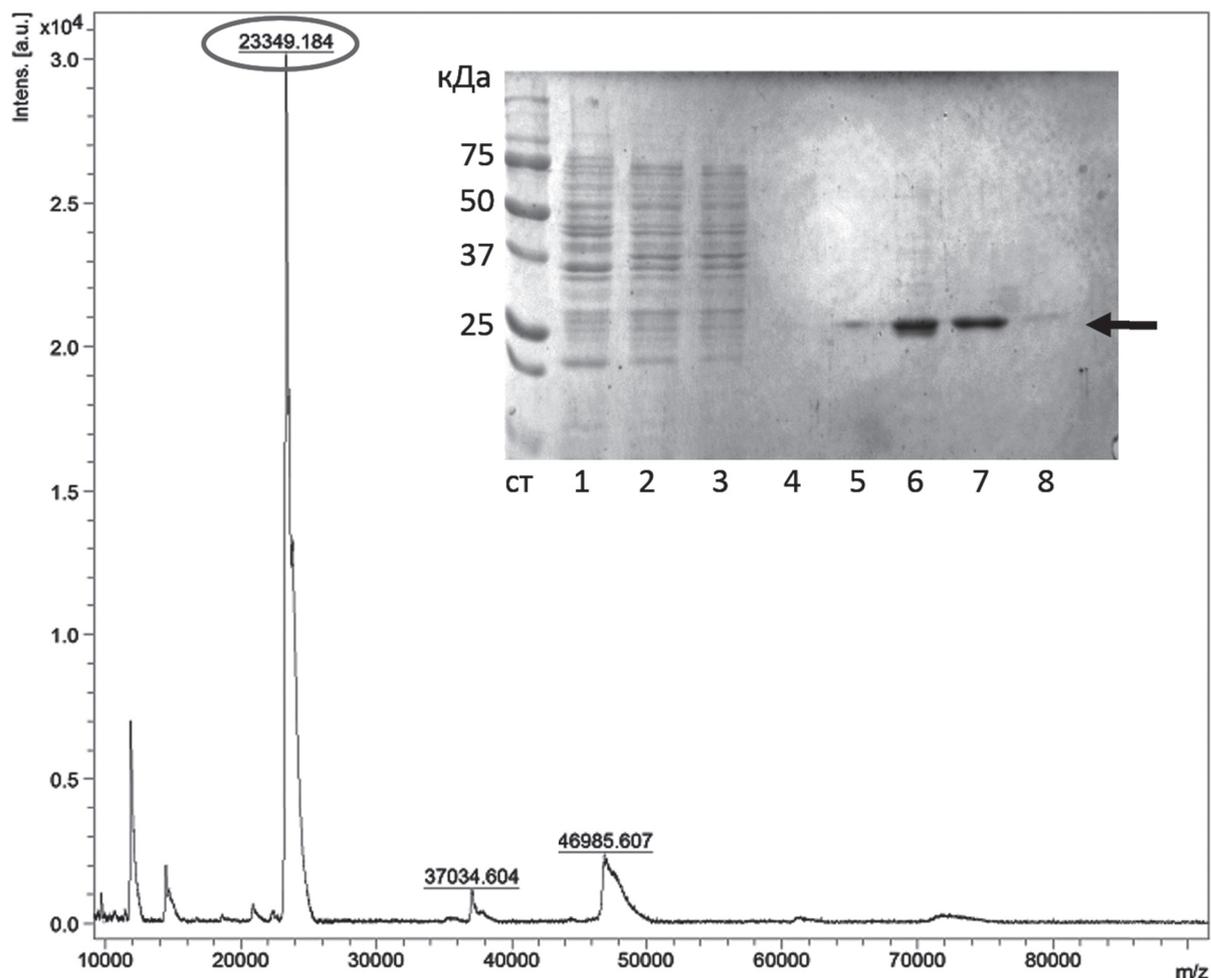


Рис. 3. Масс-спектр рекомбинантного соматотропина *G. gallus*. На вставке приведены результаты электрофореза в 15% ПААГ (в присутствии SDS). Ст – маркер молекулярных масс; 1 – элюат при нанесении белка на колонку, 2–3 – фракции, собранные при промывке; 4–8 – фракции, собранные при элюции. Стрелкой указан целевой белок

Таким образом, наиболее оптимальной является стратегия периплазматической экспрессии, при которой нет необходимости в сложных процедурах сольubilизации и рефолдинга, и получаемый белковый продукт характеризуется более высокими выходом и степенью очистки.

Список использованной литературы

1. Retinal Growth Hormone in the Chick Embryo / M. L. Baudet [et al.] // *Endocrinology*. – 2003. – Vol. 144, N 12. – P. 5459–5468.
2. Structure of the chicken growth hormone-encoding gene and its promoter region / Minoru Tanaka [et al.] // *Gene*. – 1992. – Vol. 112. – P. 235–239.
3. Optimization of inclusion bodies solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli* / Ashok K. Patra [et al.] // *Protein Expression and purification*. – 2000. – Vol. 18. – P. 182–192.
4. Solubilization of recombinant ovine growth hormone with retention of native-like secondary structure and its refolding from the inclusion bodies of *Escherichia coli* / R. H. Khan [et al.] // *Biotechnol. Prog.* – 1998. – Vol. 14 – P. 722–728.
5. Preparation and Characterization of Recombinant Chicken Growth Hormone (chGH) and Its Putative Antagonist chGH G119R Mutein / H. E. Paczoska-Eliasiewicz [et al.] // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2006. – Vol. 1091. – P. 501–508.
6. Commercial-Scale Refolding of Recombinant Methionyl Bovine Somatotropin / S. Bradley [et al.] // *Protein Refolding*. – 1991. – P. 197–202.
7. High-level expression of ovine growth hormone in *Escherichia coli*: single-step purification and characterization / K. B. C. Appa Rao [et al.] // *Protein Expression and Purification*. – 1997. – Vol. 11. – P. 201–208.
8. Complete Solubilization and Purification of Recombinant Human Growth Hormone Produced in *Escherichia coli* / Kim M.-J. [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, N 2:e56168.
9. Dalbey, R. E. Leader peptidase / R. E. Dalbey // *Molecular Microbiology*. – 1991. – Vol. 5, N 12. – P. 2855–2860.

10. *Paetzel, M.* Structure and mechanism of Escherichia coli type I signal peptidase/ *M. Paetzel* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – P. 1–10.
11. Secretion of active bovine somatotropine in Escherichia coli / *B. K. Klein [et al.]* // *Biotechnology.* – 1991. – Vol. 9 – P. 869–872.
12. High-level production and one-step purification of biologically active human growth hormone in Escherichia coli / *Reema Mukhija [et al.]* // *Gene.* – 1995. – Vol. 165 – P. 303–306.
13. High-level secretion of human growth hormone by Escherichia coli / *Clung Nan Chang [et al.]* // *Gene.* – 1987. – Vol. 55. – P. 189–196.
14. Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone / *J. T. Sockolosky [et al.]* // *Protein Expression and Purification.* – 2013. – Vol. 87, N 2. – P. 129–135.

Поступила в редакцию 15.03.2016