

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 577.112

Н. В. ИЛЬИЧЕВА*, А. П. ВОРОНИН

ФГБУН «Институт цитологии» РАН, Санкт-Петербург, 194064

e-mail: nad9009@yandex.ru

Получение рекомбинантного домена теломер-связывающего белка TRF2 и антител к нему

Нуклеотидная последовательность, кодирующая домен udTRF2 теломер-связывающего белка TRF2 человека, клонирована в экспрессионном векторе pET32a(+). Конструкцию pET32a-udTRF2 применили для трансформации бактериального штамма *E. coli* RosettaBlue(DE3). Показана способность штамма RosettaBlue(DE3)-pET32a-udTRF2 продуцировать полипептид udTRF2, который использован для получения поликлональных антител к домену udTRF2. Показано также, что данные антитела способны взаимодействовать с белком TRF2 влизате ядер, выделенных из клеток печени мыши, что указывает на возможность применения этих антител для исследования функций домена udTRF2.

Ключевые слова: антитела, молекулярное клонирование, рекомбинантный полипептид, теломер-связывающий белок TRF2.

Теломеры — сложные ДНК-белковые комплексы, находящиеся на концах хромосом эукариотических организмов. Они предотвращают слияние хромосом, предохраняют геном от потерь генетической информации при репликации линейной ДНК [1], участвуют в организации хроматина в ядре [2]. На сегодняшний день предметом многочисленных исследований является роль теломер в клеточном старении. В частности, известно, что с возрастом теломеры в клетках организма укорачиваются [3].

Белок TRF2 — один из трех ДНК-связывающих белков теломерного комплекса. Он играет важную роль в формировании особой структуры теломерной ДНК и в защите теломер от действия репарационных систем клетки [4]. Первичную аминокислотную последовательность TRF2 условно разделяют на 4 домена. Основные функции трех из них в значительной степени исследованы. Однако в его состав входит один домен, функции которого до сих пор неизвестны. Компьютерный анализ аминокислотной последователь-

Ильичева Надежда Викторовна, Воронин Алексей Петрович.

Список сокращений: а.о. — аминокислотный остаток; ОП₅₅₀ — оптическая плотность при длине волны 550 нм; ПААГ — полиакриламидный гель; п.н. — пара нуклеотидов; ПЦР — полимеразная цепная реакция; среда LB — среда Луриа — Бертани; ЭДТА — этилендиаминтетраацетат натрия; dATP — дезоксирибоденозинтрифосфат; dCTP — дезоксирибозитидинтрифосфат; dGTP — дезоксирибогуанозинтрифосфат; dNTP — дезоксирибонуклеозидтрифосфат; dTTP — дезоксириботимидин трифосфат; IPTG — изопропил-β-D-1-тиогактопиранозид; PBS — натрий-фосфатный буфер; PMSF — фенолметилсульфонилфторид; PVDF — поливинилиденфторид; SDS — додецилсульфат натрия; TAE — трис-ацетатный буфер с добавлением ЭДТА; TRF2 — telomere repeat binding factor 2; udIRF2 (unrown domain in TRF2) — домен TRF2 с неизвестной функцией; X-gal — 5-бромо-4-хлоро-3-индоил-β-D-галактопиранозид.

* Автор для переписки.

ности TRF2 показал, что существует некоторая степень гомологии между доменом TRF2 с неизвестными функциями и некоторыми участками god-домена белков ламинов, входящих в состав ядерной ламина [5]. Ядерная ламина, в свою очередь, является одним из компонентов ядерной мембраны. Показано также присутствие TRF2 в ядерной мембране ооцитов лягушки [6] и колокализация TRF2 с остатками ядерной мембраны в клетках мышцы на стадии митоза [5]. На основании этих фактов выдвинуто предположение о том, что именно домен с неизвестными функциями отвечает за взаимодействие TRF2, а значит и теломер, с ядерной мембраной. В настоящей работе домен обозначили как udTRF2.

Изучение взаимодействия теломер с ядерной мембраной представляет большой интерес для понимания процессов клеточного старения. В частности, известно, что мутация гена *LMNA*, кодирующего ламин А, белок ядерной ламина, является причиной развития различных типов прогерии, например, синдрома Хатчинсона-Гилфорда [7] и атипичного синдрома Вернера [8]. Для таких заболеваний характерно преждевременное старение организма, а в клетках больных наблюдаются нарушения в структуре ядерной мембраны и укорачивание теломер [7]. Кроме того, согласно последним данным, в клетках больных атипичным синдромом Вернера наблюдается значительное уменьшение количества TRF2 по сравнению с его содержанием в нормальных клетках [9]. Таким образом, изучение взаимодействия теломер-связывающего белка TRF2 с компонентами ядерной мембраны может пролить свет на некоторые молекулярные аспекты развития прогерии и клеточного старения в целом.

Механизмы взаимодействия TRF2 с ядерной ламиной, а также роль этого взаимодействия в обеспечении жизнеспособности клетки пока изучены недостаточно. Наши предварительные данные позволяют предположить, что именно домен TRF2 отвечает за это взаимодействие. Следовательно, пептид, соответствующий этому домену, может быть использован для нарушения этого взаимодействия индивидуально или в составе препаратов, оказывающих избирательное негативное воздействие, например, на опухолевые клетки.

Основным инструментом для изучения механизмов этого взаимодействия, а также для изучения функций рассматриваемого домена TRF2 в целом является исследование антител к нему. В настоящее время существуют антитела (Anti-TRF2 antibody ab4182, Abcam), полученные к аминокислотной последовательности, частично перекрыва-

ющейся с udTRF2. Эта последовательность не включает в себя некоторые участки, которые могут представлять интерес для изучения функций udTRF2, в частности, те, в которых была обнаружена гомология с god-доменом промежуточных филаментов [5].

Настоящая работа посвящена созданию экспрессионной системы для получения рекомбинантного полипептида, соответствующего полной последовательности домена белка TRF2 с неизвестными функциями, и получению антител к этому полипептиду.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Плазмидные ДНК. Вектор pCDNA3hTRF2Full, содержащий полный ген белка TRF2 человека, использован в качестве матрицы для амплификации нуклеотидной последовательности, кодирующей домен белка TRF2 с неизвестными функциями udTRF2. Вектор любезно предоставлен доктором Э. Джилсоном (Dr. E. Gilson, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Франция). Вектор pTZ57R/T (Fermentas, Литва) использован для промежуточного клонирования нуклеотидной последовательности, кодирующей домен udTRF2. Вектор pET32a(+) (Novagen, Германия) использован для создания экспрессионной генетической конструкции.

Праймеры для полимеразной цепной реакции (ПЦР). В работе использованы следующие пары праймеров: TRF2udNDE (5'-gccatagtctgag-tccgctgcctcaa-3') и TRF2udHind (5'-gcaagctttattttgtatattggtgtactgtct-3') — для амплификации нуклеотидной последовательности, кодирующей домен udTRF2; M13F (5'-gtaaacgacggccagt-3') и M13R (5'-ggaaacacgtatgacctg-3') — для вектора pTZ57R/T; pET32aHind (5'-tggtgctcgagtcggccgc-3') и pET32aNdeI (5'-ggaattgtgagcggataacaattcccctct-3') — для вектора pET32a(+). Олигонуклеотиды синтезированы в ООО «Синтол» (Россия).

Бактериальные культуры. В работе использованы бактериальные штаммы *E. coli* DH5 α (Invitrogen, США) и *E. coli* RosettaBlue(DE3) (Novagen, Германия). Клетки бактерий культивировали в среде LB (10 г/л пептона («Биолот», Россия), 5 г/л дрожжевого экстракта (Gibco, США), 10 г/л NaCl («Вектон», Россия)) при 37° и непрерывном перемешивании (200 об/мин). Для приготовления плотной среды в среду LB добавляли 1,5% агара (Helicon, Россия). Для выращивания бактерий, несущих векторы и генетические конструкции, в среду добавляли 50 мкг/мл ампициллина («Биохимик»,

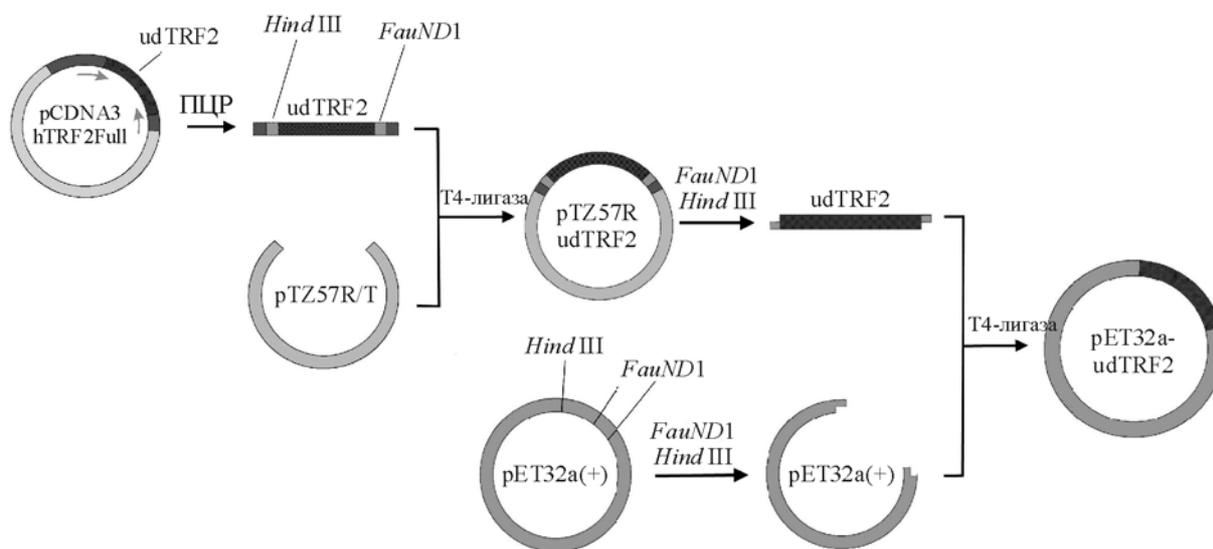


Рис. 1. Схема получения экспрессионной конструкции рЕТ32а-udTRF2

Россия). Скрининг по методу синих и белых колоний осуществляли при добавлении в среду 40 мкг/мл X-gal и 80 мкг/мл IPTG (Fermentas, Литва).

Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе Mastercycler Personal (Eppendorf, Германия) в объеме пробы 25 мкл со следующим составом реакционной смеси: матрица ДНК — 1 нг на пробу; праймеры — по 5 пмоль на пробу; dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) — в концентрации 0,2 мМ; *Taq*-полимераза («Сибэнзим», Россия) — 2 единицы на пробу; 10-кратный *Taq*-буфер («Сибэнзим») — 2,5 мкл. Смесь инкубировали при 95° в течение 5 мин, затем проводили 25 циклов амплификации по следующей программе: 95° — денатурация (30 с), 59° (55° для праймеров M13F и M13R) — отжиг (30 с), 72° — элонгация (50 с). После завершения реакции смесь инкубировали при 72° в течение 5 мин. Для разделения фрагментов ДНК использовали метод электрофореза в агарозном геле [10].

Генетические конструкции. Принципиальная схема получения генетической конструкции для экспрессии гена полипептида udTRF2 представлена на рис. 1. Молекулярное клонирование и выделение плазмид осуществляли по стандартным методикам [10]. В работе использовали T4 ДНК-лигазу (Fermentas) и рестриктазы *FauND1* и *HindIII* («Сибэнзим»). Для выделения из агарозного геля линеаризованного вектора рЕТ32а(+) применяли нестандартный способ. На траектории перемещения электрофоретических зон в геле с помощью дополнительной гребенки создавали лунку, которую заполняли буфером (0,4 М NaCl, однократный TAE + 10% глицерина) для торможения дви-

жения зоны. Электрофорез проводили в стандартных условиях [10]. В состав геля вводили 1 мкг/мл бромистого этидия (Sigma, США). За движением ДНК в геле наблюдали с помощью транслюминатора ЕТХ-20М (Vilber Lourmat, Франция). Когда целевой фрагмент ДНК входил в лунку, буфер с целевым фрагментом извлекали с помощью автоматической пипетки. ДНК осаждали из буфера изопропанолом («Вектон»)

Полученную экспрессионную генетическую конструкцию обозначили рЕТ32а-udTRF2. Последовательность конструкции определяли на секвенаторе ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием набора BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) по методике, указанной в протоколе производителя. Результаты секвенирования обрабатывали с помощью программы Sequence Scanner v.1.1.0.

Экспрессия нуклеотидной последовательности полипептида. Бактериальные клетки культивировали в термостате при 37° в течение 3,5 ч до достижения $ОП_{550} = 0,5$. Для индукции экспрессии в среду добавляли IPTG до концентрации 0,4 мМ и продолжали культивирование в течение 3 ч. Для получения контрольной культуры плазмид-содержащий штамм культивировали без добавления IPTG. Клетки осаждали центрифугированием, промывали PBS и суспендировали в лизирующем буфере (62 мМ трис-НСl (Sigma), рН 6,8, 2,5% SDS) (Sigma). Для фракционирования белков бактериального лизата проводили вертикальный SDS-электрофорез в ПААГ по Laemmli [11].

Иммуноблотинг проводили по методу [12]. Белки переносили на мембрану из PVDF (Millipore, США). В качестве первых антител использовали Anti-TRF2 (ab4182, Abcam, Великобритания) или иммунную сыворотку, а в качестве вторых — козы антитела, полученные против иммуноглобулинов G морской свинки или кролика, конъюгированные со щелочной фосфатазой (Sigma, США).

Выделение полипептида из ПААГ. Полипептид выделяли экстракцией из полиакриламидного геля. После электрофореза лизата бактериальной культуры, продуцирующей рекомбинантный полипептид, в 15%-ном ПААГ с последующим окрашиванием кумасси (MP Biomedicals, США) из геля вырезали участок с целевым полипептидом, гомогенизировали его вручную (гемогенизатор Поттера-Эльвейема объемом 3 мл) и суспендировали в буфере следующего состава: 50 мМ трис-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ PMSF (Sigma). Суспензию инкубировали при 37° в течение 2 ч, затем при 4° в течение 16 ч. Раствор отделяли от остатков геля центрифугированием. Для осаждения белка к 1 объему полученного раствора добавляли 4 объема метанола («Вектон»), 1 объем хлороформа («Вектон») и 3 объема воды и центрифугировали смесь в течение 3 мин при 12100 г. К нижней фазе добавляли 3 объема метанола и центрифугировали 5 мин при 12100 г. Осажденный белок растворяли в 20 мМ трис-HCl, pH 7,5, с добавлением 0,5 мМ PMSF.

Получение и анализ антител. Для иммунизации использовали морских свинок (беспородные самцы, 4 мес, масса 400 — 500 г, из питомника «Рапполово» РАМН). До иммунизации у животных была взята преиммунная сыворотка. Раствор полученного полипептида udTRF2 смешивали с адьювантом Фрейнда (MP Biomedicals, США) в соотношении 1:3 и вводили морским свинкам трехкратно с перерывами в 8 — 10 дней по 20 мкг полипептида на одну инъекцию. Первую иммунизацию проводили подкожно, вторую и третью — внутримышечно. Сыворотку получали на 10-е сутки после последней инъекции. Наличие в иммунной сыворотке антител к udTRF2 определяли методом иммуноблотинга, как описано выше. Для проверки был использован лизат ядер, выделенных из клеток печени мыши *Mus musculus* по стандартной методике [13], и лизат бактерий, экспрессирующих udTRF2. Иммунную сыворотку применяли в качестве первых антител в разведениях 1:500 и 1:1000.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клонирование фрагмента гена

Фрагмент гена TRF2, кодирующего домен с неизвестными функциями udTRF2 амплифицировали с помощью ПЦР. Этот фрагмент кодирует последовательность белка TRF2 с 288 по 488 аминокислоты, его длина составляет 603 п. н. Использованные в ПЦР праймеры содержат нуклеотидные последовательности, ограничивающие фрагмент, и адаптерные последовательности, необходимые для включения фрагмента гена в экспрессионный вектор. Прямой праймер TRF2udNDE (5'-gccatattgtctgagtcgctgctcaaa-3') содержит сайт рестрикции для эндонуклеазы рестрикции *FauNDI* (выделен жирным шрифтом), в котором находится старт-кодон (atg), необходимый для экспрессии полипептида. Обратный праймер TRF2udHind (5'-gcaagctttttttgttatattggtgtactgtct-3') содержит сайт рестрикции для *HindIII* и был сконструирован таким образом, что в результате амплификации фрагмент гена оказался ограниченным стоп-кодоном (taa) со стороны обратного праймера. Для эффективного встраивания фрагмента гена в экспрессионный вектор проводили клонирование фрагмента в линейаризованном векторе pTZ57R/T (см. рис. 1), который имеет выступающие dT-концы. В свою очередь, ПЦР-фрагмент содержит dA-остатки на концах, образующиеся в результате действия *Taq*-полимеразы. Было проведено лигирование ПЦР-фрагмента и вектора, а также трансформация лигазной смесью бактериальных клеток штамма *E. coli* DH5 α . Трансформированные бактериальные клетки сеяли на чашки с агаризованной средой. В качестве отрицательного контроля на чашку с антибиотиком вносили нетрансформированные компетентные клетки. Для идентификации трансформированных клеток со вставкой применяли метод синих и белых колоний. Для дополнительного анализа наличия вставки в трансформантах из белых колоний брали пробы и проводили ПЦР с праймерами M13F и M13R к вектору pTZ57R/T. Конструкция получила название pTZ57R-udTRF2.

В качестве экспрессионного вектора использовали плазмиду pET32a(+), которая обеспечивает эффективную экспрессию встраиваемых генов под контролем сильного промотора вируса T7. Вектор содержит один сайт рестрикции для эндонуклеазы *HindIII* и два сайта рестрикции для *FauNDI* (см. рис. 1), которая является изошизомером рестриктазы *NdeI*. При обработке вектора эндонуклеа-

зами *Hind*III и *Fau*NDI из него удаляются два фрагмента, кодирующие дополнительные аминокислотные последовательности (His-tag, S-tag, Txx-tag). Эти последовательности обычно используют для аффинной очистки белков (His-tag, S-tag) или для повышения их растворимости (Txx-tag). В настоящей работе эти фрагменты были удалены, чтобы в дальнейшем избежать интерференции кодируемых ими аминокислотных последовательностей с целевым полипептидом при получении антител. Вектор pET32a(+) и полученную ранее конструкцию pTZ57R-udTRF2 обрабатывали указанными выше эндонуклеазами рестрикции для создания у вектора и фрагмента гена липких концов. После лигирования фрагмента гена и вектора проводили трансформацию лигазной смесью бактериальных клеток штамма *E. coli* DH5 α . Трансформированные бактерии сеяли на чашку, содержащую агаризованную среду с ампициллином. Бактерии из полученных колоний были проверены на наличие рекомбинантной плазмиды с целевой вставкой с помощью ПЦР и инокулированы в жидкую питательную среду LB. Культуру подвергали лизису и плазмиду со вставкой выделяли из лизата. Для проверки пригодности полученной конструкции для экспрессии полипептида проводили рестрикционный анализ с помощью эндонуклеаз *Hind*III и *Fau*NDI и секвенирование. Оба метода не выявили точечные мутации. На рис. 2 представлено схематическое изображение вектора pET32a-udTRF2.

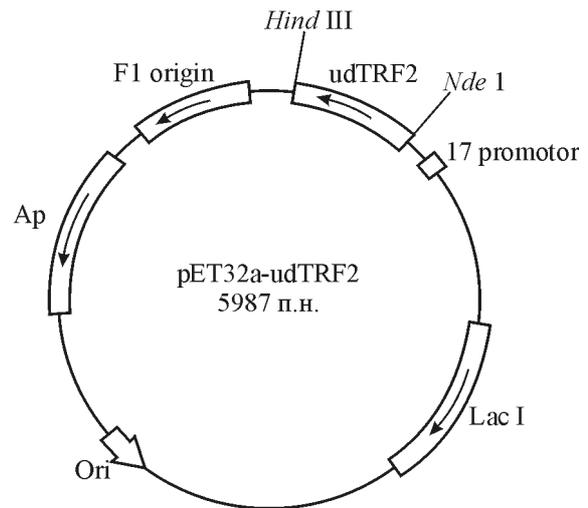


Рис. 2. Схема конструкции pET32a-udTRF2

белков бактериального лизата в SDS-ПААГ. Результаты представлены на рис. 3, где хорошо видна полоса, соответствующая целевому полипептиду. Кажущаяся молекулярная масса полипептида составляет примерно 25 кДа, а расчетная молекулярная масса — 21 кДа. Расхождение кажущейся и расчетной молекулярной массы может быть вызвано различием способности реагировать на присутствие SDS исследуемого белка и белков маркера. На рис. 3, б представлены также результаты

Экспрессия и выделение полипептида udTRF2

Была проведена трансформация экспрессионного бактериального штамма *E. coli* RosettaBlue (DE3) рекомбинантной плазмидой pET32a-udTRF2. Часть бактериальной культуры (контроль) инкубировали без добавления индуктора экспрессии, а в другую часть (индукция) добавляли IPTG. Через 3 ч после начала экспрессии была измерена оптическая плотность контрольной и индуцированной культур. Для контрольной культуры получено значение $ОП_{550} = 1,5$, а для индуцированной культуры $ОП_{550} = 0,75$. Данные об оптической плотности культур были использованы для выравнивания нагрузок на гель при последующем проведении электрофореза.

Полипептид, который предполагали получить, не содержит дополнительных аминокислотных последовательностей, которые бы способствовали его выходу из бактериальной клетки в среду, поэтому экспрессируемый полипептид определяли с помощью электрофоретического разделения

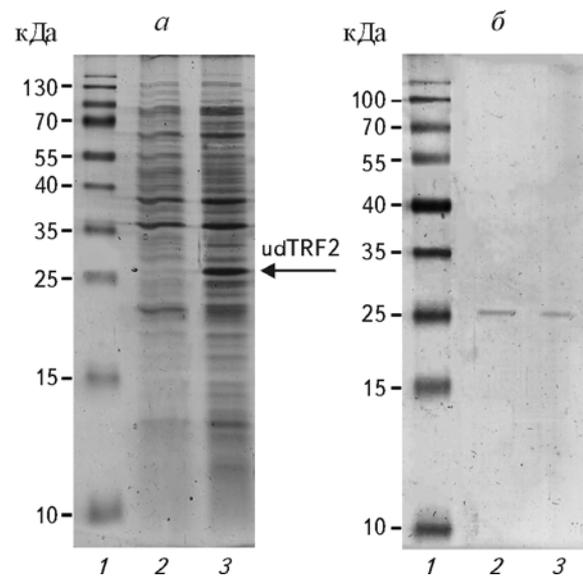


Рис. 3. Электрофорез лизатов бактериальных культур и выделенного полипептида udTRF2: а — контрольная и индуцированная культуры (15%-ый ПААГ с последующей окраской кумасси); 1 — маркеры молекулярной массы (Fermentas, Литва); 2 — контроль (без добавления IPTG); 3 — лизат после проведения индукции; б — выделенный полипептид udTRF2 (14%-ый ПААГ); 1 — маркеры молекулярной массы; 2, 3 — полипептид udTRF2

электрофореза выделенного полипептида. Его приблизительную концентрацию определяли при анализе денситограмм, полученных в результате обработки изображения геля в программе ImageJ. Концентрация белка после выделения составила около 10 мкг/мл.

Чтобы доказать, что полученный полипептид действительно является доменом белка TRF2, проведен иммуноблотинг с поликлональными антителами Anti-TRF2 ab4182 (Abcam). Эти антитела были получены к синтетическому пептиду, соответствующему аминокислотной последовательности TRF2 с 250-го по 350-й остаток. Эта последовательность частично перекрывается с доменом udTRF2, который включает аминокислоты с 288-й по 488-ю. Результаты представлены на рис. 4. На рисунке видно, что антитела практически не взаимодействуют с белками лизата контрольной культуры, а в лизате индуцированной культуры взаимодействуют с белком, идентичным по молекуляр-

ной массе целевому полипептиду. Таким образом, была доказана способность системы Rosetta-Blue(DE3)-pET32a-udTRF2 продуцировать полипептид, соответствующий домену udTRF2. Полипептид был выделен путем экстракции из ПААГ.

Анализ иммунной сыворотки

Определение антител к домену белка TRF2 с неизвестными функциями проводили методом иммуноблотинга, как описано выше. Для этого использовали лизат ядер, выделенных из клеток печени мыши, и лизат бактериальной культуры, продуцирующей полипептид udTRF2. Результаты иммуноблотинга представлены на рис. 4. По данным иммуноблотинга, антитела полученной иммунной сыворотки взаимодействуют с одним из белков ядерного лизата (см. рис. 4, в, дорожка 4). Кажущаяся молекулярная масса этого белка составляет примерно 70 кДа, что соответствует молеку-

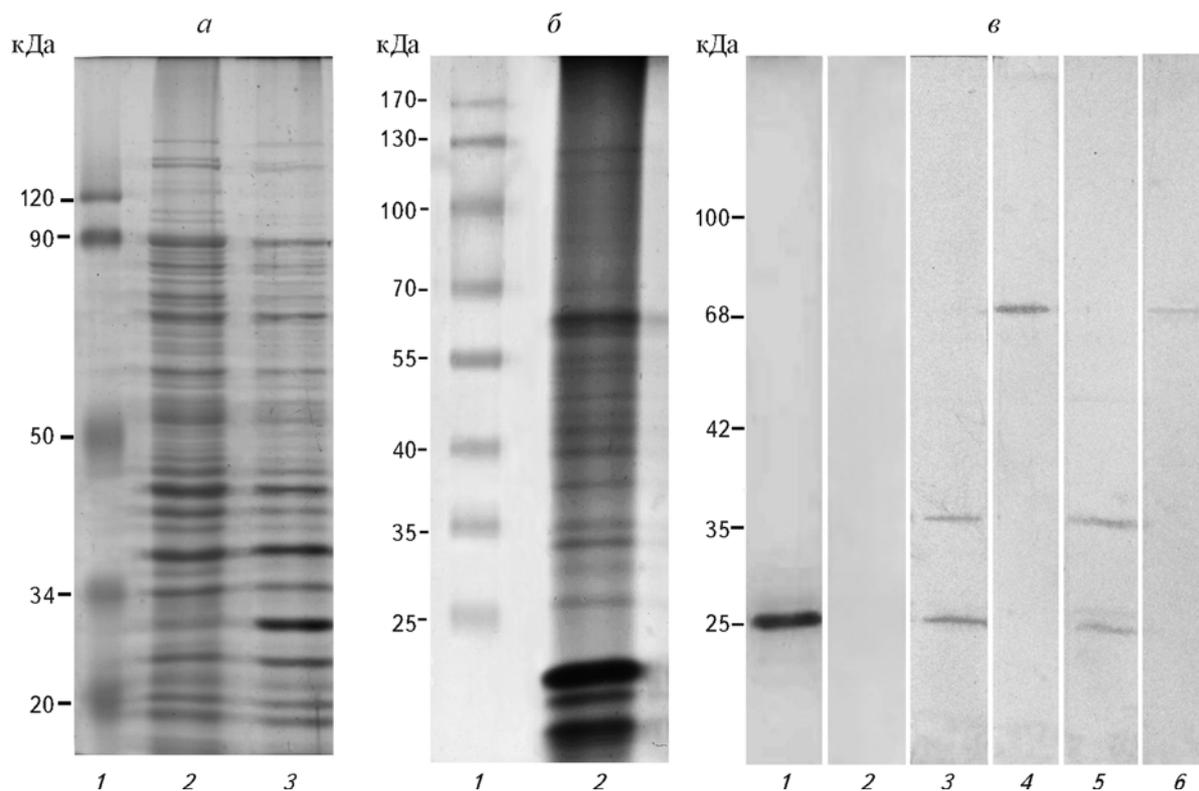


Рис. 4. Электрофорез и иммуноблотинг лизатов бактериальных культур и лизата ядер: *а* — контрольная и индуцированная культуры (10%-ный ПААГ); 1 — маркеры молекулярной массы (Thermo Scientific, США); 2 — контрольная культура; 3 — индуцированная культура; *б* — электрофорез белков лизата ядер из клеток печени мыши в 10%-ном ПААГ; 1 — маркеры молекулярной массы (Fermentas, Литва); 2 — лизат ядер; *в* — иммуноблотинг белков бактериальных лизатов и антител иммунной сыворотки; 1 — взаимодействие антител Anti-TRF2 (Abcam) с белками лизата индуцированной культуры *E. coli* RosettaBlue(DE3) pET32a-udTRF2; 2 — отсутствие взаимодействия антител Anti-TRF2 (Abcam) с белками лизата контрольной культуры *E. coli* RosettaBlue(DE3) pET32a-udTRF2; 3, 5 — взаимодействие антител иммунной сыворотки в разведениях 1:500 и 1:1000, соответственно, с белками лизата бактерий; 4, 6 — взаимодействие антител иммунной сыворотки в разведениях 1:500 и 1:1000, соответственно, с белками лизата ядер

лярной массе белка TRF2 [14]. Среди белков бактериального лизата *E. coli* RosettaBlue (DE3)-pET32a-udTRF2 антитела сыворотки взаимодействуют с двумя белками, молекулярная масса которых составляет около 35 и 25 кДа (см. рис. 4, в, дорожки 3, 5). Одним из них, по-видимому, является udTRF2.

Таким образом, в ходе настоящей работы был получен рекомбинантный полипептид, соответствующий домену udTRF2 теломер-связывающего белка TRF2, и поликлональные антитела к нему. Показана способность полученных антител взаимодействовать с белком TRF2 в лизате ядер, выделенных из клеток печени мыши *Mus musculus*, что указывает на возможность использования этих антител в исследовании потенциальных функций домена udTRF2, в частности, его взаимодействия с ядерной мембраной.

Авторы выражают благодарность А.М. Киселеву (ФГБУ «ФМИЦ им. В.А. Алмазова») за помощь в проведении секвенирования и Л.С. Адониу за помощь в работе с морскими свинками.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (ГК № 01201457147).

Получено 26.12.14

ЛИТЕРАТУРА

- Gomez, D.E. Telomere structure and telomerase in health and disease / D.E. Gomez, R.G. Armando, H.G. Farina, P.L. Menna, C.S. Cerrudo, P.D. Ghiringhelli, D.F. Alonso // *Int. J. Oncol.* — 2012. — V. 41. — P. 1561—1569.
- Cremer, T. Chromosome territories nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells / T. Cremer, C. Cremer // *Nat. Rev.* — 2001. — V. 2. — P. 292—303.
- Aubert, G. Telomeres and ageing / G. Aubert, P.M. Lansdorp // *Physiol. Rev.* — 2008. — V. 88. — P. 557—579.
- Palm, W. How Shelterin Protects Mammalian Telomeres / W. Palm, T. de Lange // *Annu. Rev. Genet.* — 2008. — V. 42. — P. 301—334.
- Voronin, A.P. A Telomere-Binding Protein (TRF2/MTBP) from Mouse Nuclear Matrix with Motives of an Intermediate Filament-Type Rod Domain / A.P. Voronin, I.B. Lobov, E. Gilson, O.I. Podgornaya // *J. Anti-aging Med.* — 2003. — V. 6. — P. 1—14.
- Бугаева Е.А. Теломер-связывающий белок из ядерной мембраны ооцита лягушки *Rana temporaria* / Е.А. Бугаева, О.И. Подгорная // *Биохимия.* — 1997. — Т. 62. — С. 1534—1546.
- De Vos, W. H. Increased plasticity of the nuclear envelope and hypermobility of telomeres due to the loss of A-type lamins / W.H. De Vos, F. Houben, R.A. Hoebe, R. Hennekam, B. van Engelen, E.M. Manders, F.C. Ramaekers, J.L. Broers, P. Van Oostveldt // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2010. — V. 1800. — N 4. — P. 448—458.
- Chen, L. LMNA mutations in atypical Werner's syndrome / L. Chen, L. Lee, B. A. Kudlow, H.G. Dos Santos, O. Sletvold, Y. Shafeghati, E.G. Botha, A. Garg, N.B. Hanson, G.M. Martin, I.S. Mian, B.K. Kennedy, J. Oshima // *The Lancet.* — 2003. — V. 362. — N 9382. — P. 440—445.
- Saha, B. DNA damage accumulation and TRF2 degradation in atypical Werner syndrome fibroblasts with LMNA mutations / B. Saha, G. Zitnik, S. Johnson, Q. Nguyen, R.A. Risques, G.M. Martin, J. Oshima // *Front. Genet.* — 2013. — V. 4. — doi: 10.3389/fgene.2013.00129
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. — М.: Мир, 1984.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* — 1970. — V. 227. — P. 680—685.
- Towbin, H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications / H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 1979. — V. 76. — N9. — P.4350—4354.
- Berezney, R. Identification of a nuclear protein matrix / R. Berezney, D. S. Coffey // *Biochem. Biophys. Res. Com.* — 1974. — V. 60. — P. 1410—1417.
- Bilaud, T. Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein / T. Bilaud, C. Brun, K. Ancelin, C.E. Koering, T. Laroche, E. Gilson // *Nat. Genet.* — 1997. — V. 17. — P. 236—239.

N.V. ILICHEVA*, A.P. VORONIN

The Institute of Cytology, Russ. Acad. Sci, 194064, St.-Petersburg Russia

e-mail: nad9009@yandex.ru

Producing of a Recombinant Domain of Telomere-Binding Protein TRF2 and Antibodies to It

A nucleotide sequence encoding udTRF2 domain of the human telomere-binding protein TRF2 was cloned in the expression vector pET32a(+). The construct (pET32a-udTRF2) was introduced by transformation in a bacterial strain *E. coli* RosettaBlue(DE3). The obtained *E. coli* RosettaBlue(DE3)-pET32a-udTRF2 strain was shown to produce the udTRF2 recombinant polypeptide. The latter was used to obtain polyclonal antibodies to the udTRF2 domain. The capacity of the antibodies to react with TRF2 in a nuclear lysate from mouse liver was shown which points out a possibility of using them for the investigation of the udTRF2 functions.

Key words: antibodies, molecular cloning, recombinant polypeptide, telomere-binding protein TRF2.

* Author for correspondence.