

УДК 577.112.083

ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ResD-ResE *Bacillus cereus*, ЭКСПРЕССИРОВАННЫХ В ШТАММАХ *Escherichia coli*

© 2013 г. Е. В. Шапырина*, А. М. Шадрин**, А. С. Солонин*

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им Г.К. Скрябина РАН, Пуццоно, 142290

**Лондонский королевский колледж, SW7 2AZ

e-mail: evshapyrina@gmail.com

Поступила в редакцию 14.05.2013 г.

Сконструированы рекомбинантные штаммы *E. coli*, экспрессирующие гены *resD* и *resE* *Bacillus cereus* ATCC 14579^T, слитые с геном убиквитина, проведена очистка белков ResD и ResE, кодируемых этими генами. Использованный подход позволил впервые получить электрофоретически гомогенные препараты этих белков, минуя стадии очистки в денатурирующих условиях. Простота разработанного метода позволила использовать его для выделения и последующего скрининга мутантных вариантов ResD и ResE с высокой производительностью. Выход рекомбинантных белков составил 150 мг/г сырой массы клеток.

DOI: 10.7868/S0555109913060160

Бактерии различных штаммов вида *Bacillus cereus* продуцируют большое количество потенциальных факторов патогенности: гемолизины, фосфолипазы, эметические токсины, энтеротоксины, металлопротеазы и коллагеназы. Показано, что синтез ряда энтеротоксинов у *B. cereus*, таких как Nhe (негемолитический энтеротоксин), Hbl (двухкомпонентный гемолизин BL), а также синтез глобального регулятора PlcR зависит от чувствительной к окислительно-восстановительному потенциалу среды двухкомпонентной системы (ДС) сигнальной трансдукции ResDE, отвечающей за регуляцию генов микроаэробного и анаэробного метаболизма у бактерий рода *Bacillus* [1, 2]. ДС состоит из связанной с мембраной сенсорной гистидинкиназы ResE и цитоплазматического регулятора ответа ResD [3–5]. Свойства данной ДС хорошо изучены у непатогенного вида *B. subtilis*, однако лишь недавно появились первые работы по изучению роли ДС ResDE в регуляции продукции токсинов *B. cereus* [6, 6а, 7]. Эти исследования указывают на ключевую позицию ДС ResDE в иерархии регуляции различных сигналов, отвечающих за выбор пути синтеза тех или иных токсинов. В то же время, согласно исследованиям “European Food Safety Authority” [8], *Bacillus cereus sensu lato* входит в группу лидеров среди бактерий, вызывающих пищевые отравления. Эти факты указывают на необходимость исследования механизмов действия ДС ResDE на молекулярном уровне, расшифровка которых позволит разработать подходы к терапии заболеваний, вызванных *B. cereus*, а также создаст предпосылки для разработки нового класса лекарственных средств, “выключающих” продукцию токсинов.

Поскольку ResD является транскрипционным регулятором, важным аспектом исследований механизма действия ДС ResDE представляется изучение взаимодействия ДНК с белком ResD как в апо-, так и в фосфорилированной форме.

Цель работы – создание системы для экспрессии и очистки транскрипционного регулятора ResD и функциональной части сенсорной гистидинкиназы ResE, позволяющей получить каталитически активные гомогенные препараты белков с высоким выходом.

МЕТОДИКА

Реактивы. В состав сред для выращивания бактерий входили: бакто-триптон, бакто-дрожжевой экстракт, сердечномозговая вытяжка ВНИ (Brain Heart Infusion) фирмы “Difco”, США. Также в работе были использованы эндонуклеазы рестрикции, реактивы для ПЦР, ДНК-полимераза и ДНК-лигаза бактериофага Т4 (“Fermentas”, Литва; “СибЭнзим”, Россия), реактивы для электрофореза в ПААГ (“Sigma”, США). Олигонуклеотиды синтезированы в фирме “Евроген” (Россия).

Культивирование бактерий и использованные плазмиды. Штаммы бактерий и плазмиды представлены в таблице. Клетки *E. coli* выращивали при температуре 37, 28, 18, 16°C на качалке (180 об/мин) в среде Лурия–Бертони (LB) с добавлением антибиотиков: ампициллин 50–100 мкг/мл; хлорамфеникол 30 мкг/мл; канамицин 25 мкг/мл, рифампицин 100 мкг/мл. *B. cereus* ATCC 14579^T культивировали в среде, содержащей сердечно-мозговую вытяжку, при температуре 28°C и интенсивности перемешивания 180 об/мин в колбах на качалке.

Штаммы и плазмиды, использованные в работе

Штамм или плаزمида	Характеристика	Источник
<i>Bacillus cereus</i>	Типовой штамм <i>B. cereus</i>	ATCC14579 ^T = ВКМ B-504 ^T = JCM 2152 ^T = 6A5 BGSC
Escherichia coli		
BL21(DE3)	-ompT hsdS _B (r _B ⁻ , m _B ⁻) gal dcm (DE3) не содержит ompT и lon протеазы, что позволяет выделить рекомбинантный продукт интактным	“Novagen”
C41(DE3)	F-ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3), производный BL21(DE3), обычно используемый для экспрессии токсичных или труднорастворимых белков, так как имеет не охарактеризованную мутацию, обеспечивающую устойчивость к токсичным белкам	“Novagen” [9]
HMS174(DE3)	F- recA1 hsdR(rK12- mK12+) (DE3), Rif ^R , обладает recA мутацией, что приводит к снижению гомологичной рекомбинации и, в конечном итоге к стабилизации рекомбинантных генов	“Novagen”
M15[pREP4]	<i>E. coli</i> K12 (nal ^s str ^s rif ^s lac ⁻ ara ⁻ gal ⁻ mtl ⁻ F ⁻ recA ⁺ , uvr ⁺ lon ⁺) pREP4 – Km ^R	“Qiagen”
JM109	endA1, recA1, gyrA96, thi, ΔΔ(lac-proAB), hsdR17(r _k ⁻ m _k ⁻), supE44, relA1, [F ⁺ , traD36, proAB, lacI ^s , ZΔΔM15];	[10]
TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Ф80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG, сине-белая селекция	“Invitrogen”
Плазмиды		
pUC128	Вектор для клонирования, Amp ^R	[11]
pET19mod	Вектор для экспрессии рекомбинантных белков под контролем сильного промотора РНК-полимеразы бактериофага T7, Amp ^R	[12]
pQE30	Вектор для экспрессии рекомбинантных белков под контролем сильного промотора РНК-полимеразы бактериофага T5, Amp ^R	“Qiagen”
pHUE	(His-tagged Ub expression vector) – вектор для экспрессии аутентичных рекомбинантных белков, Amp ^R	[13]
pLacIRARE	Вектор для восполнения редких tPHK у <i>E. coli</i> , Cm ^R	“Novagen”
pT-GroE	Вектор, экспрессирующий GroES шаперон <i>E. coli</i> под контролем промотора бактериофага T7, Cm ^R Шапероны снижают количество “телец включения”, так как могут участвовать в правильном фолдинге рекомбинантного белка	[14]
pUC128-resD	Производная pUC128, содержащая клонированную по сайту EcoRV ОРС гена resD, Amp ^R	Данная работа
pUC128-resE	Производная pUC128, содержащая клонированную по сайту EcoRV ОРС гена resE, Amp ^R	То же
pET19mod-resD	pET-19mod, содержащая ОРС гена resD, Amp ^R	»
pET19mod-resE	pET-19mod, содержащая ОРС гена resE, Amp ^R	»
pQE30-resD	pQE30, содержащая ОРС гена resD, Amp ^R	»
pQE30-resE	pQE30, содержащая ОРС гена resE, Amp ^R	»
pHUE-Ub-resD	pHUE, содержащая ОРС гена resD, Amp ^R	»
pHUE-Ub-resE	pHUE, содержащая ОРС гена resE, Amp ^R	»
pET-TEV	Вектор на основе вектора pET для экспрессии TEV- протеазы, Amp ^R	[15]
pHUsp2cc	Вектор на основе вектора pHUE для экспрессии деубиквитиназы Usp2-cc, Amp ^R	[13]

Общие методы. Выделение хромосомной ДНК, клонирование ДНК и трансформацию компетентных клеток проводили согласно стандартным методикам [16]. Для быстрого выделения плазмидной ДНК и препаративного выделения фрагментов ДНК из геля использовали наборы реактивов фирмы “Promega” (США) Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System и Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System соответственно.

Получение векторов для сверхэкспрессии рекомбинантных белков ResD и ResE (1-195). Открытые рамки считывания (ОРС) генов *resD* и *resE* (1-195) амплифицировали с геномной ДНК типового штамма *B. cereus* ATCC 14579^T с помощью сочетаний праймеров *resD*for (5'-GGCTC-GAGAATGAATCAAGAATTTTAAT-3', XhoI) и *resD*rev (5'-GGGGATCCCTCAGTCGTTTCACAAC-STCAA-3', BamHI), *resE*for (1-195) (5'-GGCTC-GAGTCTACTCGGATTACAGCAA-3', XhoI) *resE*rev (5'-GGGGATCCCTAAATTATACGATTTCG-GTA-3', BamHI). Ген *resE* клонировали без 585 п.н. последовательности, кодирующей N-концевой гидрофобный трансмембранный домен белка длиной 195 аминокислот [17]. Очищенные ПЦР-фрагменты клонировали в EcoRV сайт pUC128. BamHI-XhoI-фрагменты из векторов pUC128-*resD* и pUC128-*resE*, содержащие последовательности генов *resD* и *resE* (1-195) (717 п.н. и 1188 п.н. соответственно), клонировали в плаزمиды pET19mod и pQE30, раскрытых по сайтам BamHI-XhoI, в результате чего получили векторы pET19mod-*resD*, pET19mod-*resE*, pQE30-*resD* и pQE30-*resE*. Для клонирования последовательностей генов *resD* и *resE* в pHUE, ОРС этих генов амплифицировали с использованием сочетаний праймеров *resD*-UbF (5'-ATCTCCGCGGTGG-TATGGAAAATGAATCAAGAAT-3', SacII) – *resD*-UbR (5'-TCAAGAAT-3', SacII) – *resE*-UbR (5'-ССАААGCTTCAGTCGTTTCACAACCT-САААТТТG-3', HindIII). ПЦР-фрагменты, содержащие гены *resD* и *resE* (1-195), клонировали в pHUE, раскрытом по сайтам SacII и HindIII, в результате чего были получены плазмиды pHUE-Ub-*resD* и pHUE-Ub-*resE*. Последовательности векторов pET19mod-*resD*, pQE30-*resD*, pHUE-Ub-*resD*, pET19mod-*resE*, pQE30-*resE*, pHUE-Ub-*resE* были подтверждены секвенированием. Для получения штаммов-продуцентов полученными плазмидами трансформировали соответствующие штаммы для сверхэкспрессии белков ResD и ResE в сочетании со вспомогательными плазмидами (pT-GroE, pLacIRARE).

Экспрессия рекомбинантных белков His₆-ResD и His₆-ResE (1-195). Ночную культуру *E. coli*, трансформированного плазмидой для сверхэкспрессии, разводили в 100 раз в среде LB, содержащей селективные антибиотики. Клетки выращивали в 4.0 л среды при 37°C до ОП₅₉₀ 0.4–0.6 при интенсив-

ной аэрации. Экспрессию His₆-ResD и His₆-ResE (1-195) индуцировали, добавляя изопропилтиога-лактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 200–500 мкМ и дальнейшее культивирование продолжали при 18°C в течение 18 ч. После инкубации клетки отделяли центрифугированием на центрифуге Beckman J2-21 (США) 30 мин при 10000 g и хранили при –70°C.

Экспрессия рекомбинантных белков His₆-Ub-ResD и His₆-Ub-ResE (1-195). Для экспрессии рекомбинантных белков His₆-Ub-ResD и His₆-Ub-ResE (1-195) клетки выращивали в 2.0 л среды LB, содержащей ампицилин (100 мкг/мл) при 37°C до достижения культурой ОП₅₉₀ = 0.6–0.7. Затем синтез белков индуцировали добавлением 500 мкМ ИПТГ и культивировали в течение 4 ч. Клетки осаждали 20 мин при 10000 g на центрифуге Beckman J2-21 (Германия) и хранили при –70°C.

Очистка рекомбинантных белков. Белки His₆-ResD, His₆-ResE (1-195), His₆-Ub-ResD и His₆-Ub-ResE (1-195) очищали методом металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA-агарозе (“BioRad”, США) из штаммов-суперпродуцентов *E. coli* (таблица), согласно рекомендациям фирмы “Qiagen” (США) с небольшими изменениями. Рекомбинантная гистидинкиназа ResE в обоих случаях не несет 195 аминокислотных остатков на N-конце.

Белки His₆-ResD и His₆-ResE(1-195) очищали несколькими способами с применением буферов А, В, С или D. Буфер А содержал 50 мМ трис-НСl, рН 7.5, 0.5 М NaCl, 10 мМ имидазол. Буфер В содержал 50 мМ трис-НСl, рН 7.5, 0.5 М NaCl, 10 мМ имидазол, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 0.3% тритон X-100. Буфер С содержал 50 мМ NaH₂PO₄, рН 7.5, 600 мМ NaCl, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 10 мМ имидазол. Буфер D имел тот же состав, что и буфер А, но с добавлением ДНКазы I (200 мкг/мл) и 1 мМ ингибитора протеаз фенолметилсульфонилфторида (ФМСФ). При выделении белков His₆-Ub-ResD и His₆-Ub-ResE(1-195) использовали только буфер А. His₆-ResD и His₆-Ub-ResD диализовали против буфера Е (25 мМ трис-НСl, рН 7.5, 150 мМ NaCl, 50%-ный глицерин). Растворы очищенных белков His₆-ResE и His₆-Ub-ResE диализовали против буфера F, содержавшего 25 мМ трис-НСl (рН 7.5), 150 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂, 50%-ный глицерин.

На первом этапе очистки 5 г сырой массы клеток *E. coli* ресуспендировали в 20 мл соответствующего буфера с добавлением лизоцима (10 мг/мл) и инкубировали во льду 30 мин. Клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе “MSE” (Англия) в следующем режиме: 6 циклов по 15 с с интервалами между циклами 1 мин при мощности 150 W и частоте ультразвука 10 кГц. Гомогенат центрифугировали в течение 1 ч при 10000 g и 4°C. Супернатант наносили на колонку с 1 мл Ni²⁺-нитрилтриаце-

татной агарозы (Ni-NTA, “Sigma”, США), предварительно уравновешенную соответствующим буфером А. После промывания колонки 10 об. исходного буфера А связавшиеся белки элюировали ступенчатым градиентом концентрации имидазола (20, 50, 100, 150 и 250 мМ). Белковые фракции анализировали при помощи электрофореза в 12- или 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях по методу Лэмли [18]. Для удаления полигистидиновой аффинной метки рекомбинантные белки инкубировали с TEV-протеазой (в молярном соотношении 1 : 10) в течение 12 ч в буфере для диализа (буферы Е и F). Очистку TEV-протеазы проводили как описано в работе [15]. Фракции, содержащие искомые белки, объединяли и диализовали против буфера Е- для ResD, и буфера F- для ResE(1-195), и хранили при -20°C .

Очистка рекомбинантных белков His₆-Ub-ResD и His₆-Ub-ResE (1-195). His₆-Ub-ResD и His₆-Ub-ResE (1-195) выделяли из суперпродуцентов *E. coli* согласно рекомендациям фирмы “Qiagen” с небольшими изменениями, используя буфер А. Для удаления полигистидиновой метки и убиквитина растворы белков инкубировали с деубиквитиназой Usp2-сс в молярном соотношении 1 : 10 в течение ночи в буфере Е для диализа. Выделение и очистку Usp2-сс проводили согласно рекомендациям [13].

Концентрацию белков определяли спектрофотометрическим методом, исходя из коэффициента экстинкции, рассчитанного при помощи программы Peptide Property Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html>), используя реактив Брэдфорд.

Фосфорилирование ResD гистидинкиназой ResE. Реакцию фосфорилирования ResD проводили в присутствии АТФ. ResD (9.6 мкМ) и/или ResE (1-195) (5.9 мкМ) инкубировали с 1 мкКю $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-АТФ}$ при комнатной температуре в течение 15 мин в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl, рН 7.5, 50 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 10%-ный глицерин, 4 мМ дитиотреитол (ДТТ) и 4 мМ MgCl₂. Реакцию останавливали, добавляя к образцу денатурирующий буфер для электрофореза. Образцы анализировали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях по методу Лэмли [18]. Гель экспонировали с рентгеновской пленкой “Retina” (Германия) в течение ночи.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Работы, посвященные изучению рекомбинантных белков ResD и ResE *B. subtilis*, показали, что очистка этих белков сопряжена со значительными трудностями, которые заключались как в низком выходе продуктов, так и в их низкой растворимости, поэтому авторы применяли очистку белков в денатурирующих условиях, а также слияние с

другими белками и аффинную хроматографию [19]. При очистке белков ResD и ResE другого вида бацилл — *B. cereus*, могли возникнуть те же трудности. Анализ последовательностей генов *resD* и *resE* *B. cereus* с помощью программы JCAT (Codon Adaptation Tool) (www.jcat.de) выявил низкое совпадение по частоте используемых кодонов по сравнению с *E. coli*: индекс CAI (Codon Adaptation Index), составил 0.63 и 0.37 для *resD* и *resE* соответственно. Полученные значения указывают на то, что использование системы трансляции *E. coli* может снижать общий выход и нарушать правильный фолдинг этих белков. В данной работе нами были предложены оптимальные условия для экспрессии и очистки белков двухкомпонентной системы ResD-ResE *B. cereus* в одну стадию.

Получение и очистка белков ResD и ResE. Для выбора оптимальной системы экспрессии генов *resD* и *resE* *B. cereus* были созданы плазмидные векторы, содержащие открытые рамки считывания генов *resD* и *resE*: pET19mod-*resD*, pQE30-*resD*, pHUE-*resD*, pET19mod-*resE*, pQE30-*resE*, pHUE-*resE*. Системы экспрессии pET19mod и pQE30, экспрессирующие рекомбинантные белки под контролем промоторов бактериофагов T7 и T5 соответственно, хорошо себя зарекомендовали и широко применяются для очистки белков из *E. coli*. В системах экспрессии на основе векторов серии pQE выход целевого белка обычно ниже, чем в системах на основе pET, поскольку мРНК синтезируется РНК-полимеразой *E. coli*, а не как в системах pET — за счет РНК-полимеразы бактериофага T7, которая в приблизительно в 3 раза эффективнее РНК-полимеразы *E. coli*. Однако соответствие уровня транскрипции уровню трансляции иногда необходимо для правильного фолдинга белка и в таких случаях системы на основе pQE более выигрышны. pHUE — относительно новая система, которая позволяет получить в результате экспрессии гена гибридный белок, слитый с убиквитином, что часто позволяет повышать растворимость труднорастворимых белков [13, 20, 21].

При экспрессии белков ResD и ResE с помощью классических систем экспрессии (pET19mod и pQE30) нами был проведен скрининг штаммов-продуцентов, для которых были оптимизированы концентрации индуктора ИПТГ и температура культивирования. Кроме того, в качестве хозяина дополнительно тестировали штаммы *E. coli*, несущие системы коэкспрессии шаперона GroE pT-GroE, для солюбилизации белков и системы pLacIRARE для восполнения редких тРНК (рис. 1). В результате проведенных экспериментов выяснилось, что наибольший выход белка ResD получен у штамма HMS174(DE3)/pLacIRARE (рис. 1, дорожки 4 и 5), а белка ResE — у штамма HMS174(DE3) (рис. 1, дорожки 13 и 14). В этих оптимальных условиях максимальный выход белков составил 0.1 мг на 1.0 г (сырой массы) клеток. При

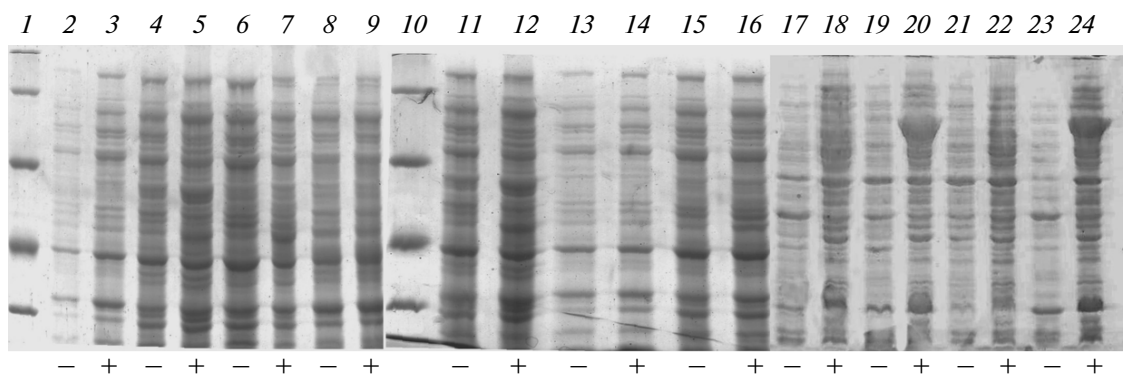


Рис. 1. Электрофоретическое разделение общих белков клеток различных экспрессионных штаммов *E. coli* в 15%-ном ПААГ. “–” – до внесения индуктора, “+” – после добавления 0.5 мМ ИПТГ с последующей инкубацией в течение 18 ч при 18°C в среде LB. 1, 10 – маркер молекулярной массы “Fermentas” (14.4–116 кДа); 2, 3 – BL21(DE3)/pLacIRARE/pET19mod-*resD*; 4, 5 – HMS174(DE3)/pLacIRARE/pET19mod-*resD*; 6, 7 – M15/pREP4/pQE30-*resD*; 8, 9 – C41(DE3)/pLacIRARE/pET19mod-*resD*; 11, 12 – HMS174(DE3)/pTGroE/pET19mod-*resD*; 13, 14 – HMS174(DE3)/pLacIRARE/pET19mod-*resE*; 15, 16 – BL21(DE3)/pLacIRARE/pET19mod-*resE*; 17, 18 – M15/pREP4/pQE30-*resE*; 19, 20 – C41 (DE3)/pLacIRARE/pET19mod-*resE*; 21, 22 – BL21(DE3)/pTGroE/pET19mod-*resE*; 23, 24 – HMS174(DE3) /pTGroE/pET19mod-*resE*.

этом более 90% белка находилось в “тельцах включения”. Снижение температуры выращивания до 16–18°C и концентрации ИПТГ до 0.05 мМ не привели к увеличению растворимости исследуемых белков, так же, как и введение в клетки дополнительной плазмиды pT-GroE (рис. 1).

Оптимизация состава буферов для выделения рекомбинантных белков посредством металл-хелатной хроматографии не привела к повышению растворимости белков. Кроме того, полагая, что ResD может связываться с ДНК и поэтому его выход может снижаться, очистка этого белка была проведена в буфере D, содержащем ДНКазу. Тем не менее, выход целевого продукта увеличивался

только в 2 раза и составлял 0.2–0.4 мг на 1.0 г (сырой массы) клеток.

Напротив, при экспрессии генов *resD* и *resE* в убиквитиновой системе pHUE все исследованные штаммы имели высокие выходы растворимых белков, по сравнению классическими экспрессионными системами вне зависимости от штамма–продукента. Поскольку между штаммами–продукентами не было существенных различий, в дальнейшей работе использовали штамм HMS174(DE3). Индукция экспрессии клонированных генов 0.5–1.0 мМ ИПТГ в штаммах с

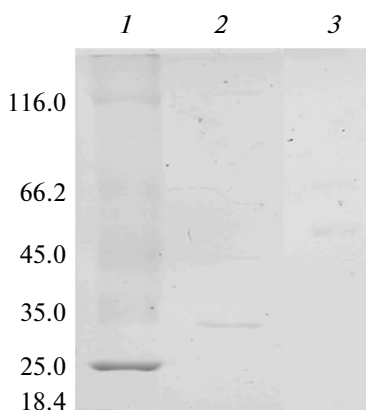


Рис. 2. Электрофореграммы препаратов очищенных рекомбинантных белков His₆-ResD в буфере D из штамма HMS174(DE3)/pLacIRARE/pET19mod-*resD* в 12%-ном ПААГ. 1 – маркер молекулярной массы “Fermentas” (14.4–116 кДа); 2 – препарат ResD; 3 – препарат ResE (1-195).

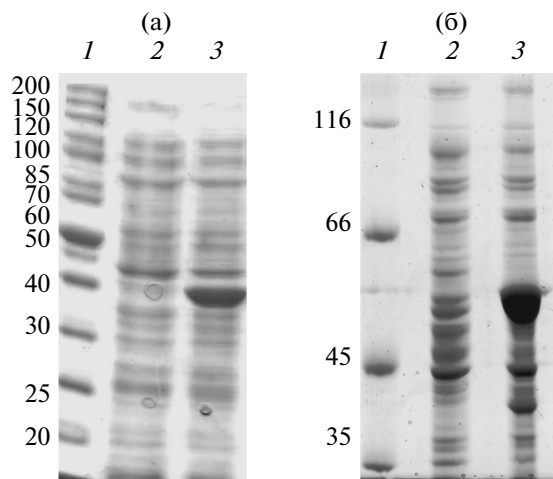


Рис. 3. Электрофоретическое разделение в 12%-ном ПААГ общих белков клеток экспрессионных штаммов *E. coli* HMS174(DE3)/pHUE-Ub-*resD* (а) и HMS174(DE3)/pHUE-Ub-*resE* (б). 1 – маркер молекулярной массы, “–” 2 – до внесения индуктора, “+” 3 – после добавления 1.0 мМ ИПТГ с последующей инкубацией в течение 4 ч при 37°C в среде LB.

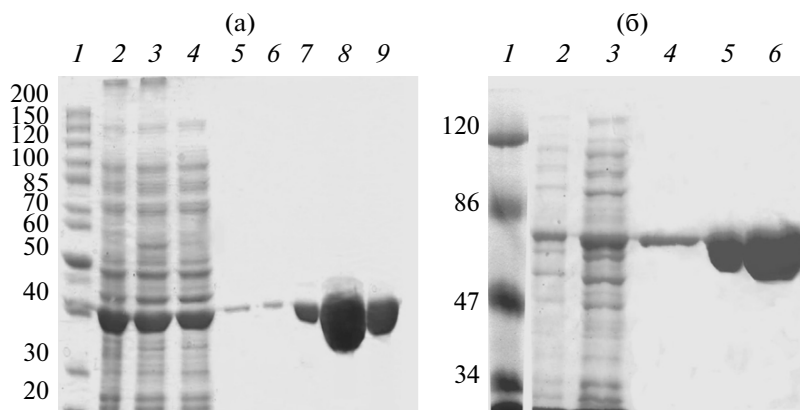


Рис. 4. Электрофоретическое разделение в 12%-ном денатурирующем ПААГ белковых фракций, содержащих рекомбинантные белки His₆-Ub-ResD (а) и His₆-Ub-ResE (б), в ходе очистки на Ni²⁺-NTA-агарозе. а – выделение His₆-Ub-ResD в буфере А: 1 – маркер молекулярной массы; 2 – индукция; 3 – растворимая фракция; 4 – супернатант, фракций содержащих 30 мМ имидазол, 5 – 40 мМ имидазол; 6 – 50 мМ имидазол; 7 – 100 мМ имидазол (38.1 кДа); 8, 9 – 200 мМ имидазол. б – выделение белка His₆-Ub-ResE в буфере А (56.6 кДа): 1 – маркер молекулярной массы; 2 – индукция; 3 – растворимая фракция; 4 – фракции, содержащие 50 мМ имидазол; 5 – 100 мМ имидазол; 6 – 200 мМ имидазол.

плазмидами рНUE-*resD* или рНUE-*resE* обеспечила успешную продукцию рекомбинантных белков при 37°C, причем до 80–95% целевых белков находились в растворимой фракции.

При последующей очистке белков ResD и ResE аффинной хроматографией были получены электрофоретически гомогенные препараты исследуемых белков с молекулярными массами 27 и 46 кДа соответственно, что полностью совпадало с расчетами (рис. 3, 4). Выход целевых белков составил около 200 мг белка на 1.0 г (сырой массы) клеток, что в 1000 раз выше, чем в случае использования классических систем.

Увеличение количества экспрессируемых ResD и ResE в системе рНUE можно объяснить следующими причинами. Во-первых, добавление убиквитина на N-конце белка может повышать эффективность трансляции и стабилизировать структуру белка, который перестает быть мишенью для внутриклеточных протеаз, так как сам убиквитин устойчив к их действию [21]. Во-вто-

рых, убиквитин способен выполнять функцию шаперона и обеспечивать правильную посттрансляционную сборку белка. В-третьих, убиквитин хорошо растворим в воде и не содержит цистеиновых остатков, что способствует повышению растворимости рекомбинантного полипептида посредством изменения поверхностного заряда белковой глобулы [22–24].

Фосфорилирование ResE и ResD. Еще одним возможным достоинством убиквитиновой системы является получение белков без аффинных меток при помощи обработки убиквитинирующим ферментом. При этом исключается влияние дополнительных аминокислотных остатков на активность белков. Для подтверждения того, что выделенные белки обладали функциональной активностью, была проведена реакция автофосфорилирования ResE в присутствии [γ -³²P]-АТФ, а также реакция фосфорилирования ResD в присутствии гистидинкиназы ResE. Очищенный препарат белка ResE проявлял ожидаемую автофосфорилирующую активность, а также фосфорилировал ResD (рис. 5). Полученные результаты согласуются с ранее полученными данными по фосфорилированию белков системы ResD-ResE у *B. subtilis* [26].

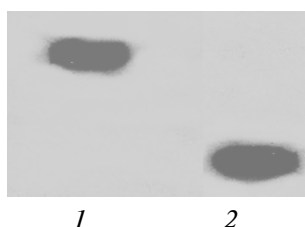


Рис. 5. Фосфорилирование ResD гистидинкиназой ResE (1-195). 1 – автофосфорилирование гистидинкиназы ResE в присутствии радиоактивно меченого [γ -³²P]-АТФ, 2 – перенос фосфорильной группы с гистидинкиназы на регулятор ResD.

Предлагаемый подход к экспрессии рекомбинантных генов *resD* и *resE* впервые позволил значительно ее увеличить, что привело также к увеличению выхода целевых продуктов по сравнению с “классическими методами” до 150 мг белка на 1 г (сырой биомассы). Кроме того, это дало возможность очистить белки двухкомпонентной системы в одну стадию, не прибегая к ренатурации полипептидов из “телец включения”. Установлено, что очищенные таким способом белки

ResD и ResE обладали биологической активностью. Полученные результаты могут найти применение при изучении не только белков системы ResDE, но и других труднорастворимых белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen R.T. M.L., Tsen H.Y. // J. Appl. Microbiol. 2002. V. 92. P. 912–919.
2. Duport C., Zigha A., Rosenfeld E., Schmitt P. // J. Bacteriol. 2006. V. 188. № 18. P. 6640–6651.
3. Sun G., Sharcova E., Chesnat R. et al. // J. Bacteriol. 1996. V. 178. P. 1374–1385.
4. Nakano M.M., Dailly Y.P., Zuber P., Clark D.P. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. P. 6749–6755.
5. Hartig E., Geng H., Hartmann A., Hubacek A., Munch R., Ye R.W., Jahn D., Nakano M.M. // J. Bacteriol. 2004. V. 186. P. 6477–6484.
6. Nakano M.M., Zuber P., Glaser P., Danchin A., Hulett F.M. // J. Bacteriol. 1996. V. 178. P. 3796–3802.
- 6a. Esbelin J., Armengaud J., Zigha A., Duport C. // J. Bacteriol. 2009. V. 191. № 13. P. 4419–4426.
7. Duport C., Zigha A., Rosenfeld E., Schmitt P. // J. Bacteriol. 2006. V. 188. № 18. P. 6640–6651.
8. The Community Summary Report: Food – Born Outbreaks in the European Union in 2007 // The EFSA Journal. 2009. V. 271. P. 1–129.
9. Miroux B., Walker J.E. // J. Mol. Biol. 1996. V. 260. P. 289–298.
10. Yanish-Perron C., Vieira J., Messing J. // Gene. 1985. V. 33. P. 103–119.
11. Keen N.T., Tamaki S., Kobayashi D., Trollinger D. // Gene. 1988. V. 70. № 1. P. 191–197.
12. Alexandrov K., Simon I., Yurchenko V., Iakovenko A., Rostkova E., Scheidig A.J., Goody R.S. // Eur. J. Biochem. 1991. V. 265. P. 160–170.
13. Butt T.R., Jonnalagadda S., Monia B.P., Sternberg E.J., Marsh J.A., Stadel J.M., Ecker, Crooke S.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. 86. № 8. P. 2540–2544.
14. Yasukawa T., Kanei-Ishii C., Maekawa T., Fujimoto J., Yamamoto T., Ishii S. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. № 43. P. 25328–25331.
15. Catanzariti A., Soboleva T.A., Jans D.A., Board P.G., Baker R.T. // Protein Science. 2004. V. 13. P. 1331–1339.
16. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Ed. 2. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1626 p.
17. Nakano M.M., Zhu Y., LaCelle M., Zhang X., Hulett F.M. // Mol. Microbiol. 2000. V. 37. № 5. P. 1198–1207.
18. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
19. Zhang X., Hulett M. // Mol. Microbiol. 2000. V. 37. № 5. P. 1208–1219.
20. McNulty D.E., Claffee B.A., Huddleston M.J., Kane J.F. // Protein Expr. Purif. 2003. V. 27. P. 365–374.
21. Baker R.T. // Curr. Opin. Biotechnol. 1996. V. 7. P. 541–546.
22. Sharp P.M., Wen-Hsiang L. // J. Mol. Evol. 1987. V. 25. P. 58–64.
23. Bachamir A., Finley D., Varshavsky A. // Science. 1986. V. 234. P. 179–186.
24. Pelham H. // Nature. 1988. V. 322. P. 776–777.
25. Bond U., Schlesinger M.J. // Mol. Cell. Biol. 1985. V. 5. P. 949–956.

Purification of Recombinant *Bacillus cereus* ResD-ResE Proteins Expressed in *Escherichia coli* Strains

E. V. Shapyrina^a, A. M. Shadrin^b, and A. S. Solonin^a

^a Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

^b Imperial College, London, United Kingdom

e-mail: evshapyrina@gmail.com

Received May 14, 2013

Abstract—Recombinant *E. coli* strains expressing the *Bacillus cereus* ATCC 14579^T *resD* and *resE* genes fused with the ubiquitin gene were constructed, and purification of the ResD and ResE proteins was performed. The approach used in the study allowed us to increase the protein yield of the electrophoretic homogeneous ResD and ResE proteins without denaturation steps up to 150 mg per gram of wet cell weight.