

УДК 576.8

## КЛОНИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ И ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ *Escherichia coli* БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА SURF-6, ТРАНСЛЯЦИОННО СЛИТОГО С ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗОЙ

© 2011 г. М. Ю. Кордюкова, О. В. Зацепина, М. А. Ползиков

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997

e-mail: zatsepina\_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 20.07.2010.

Аmplифицировали и клонировали в вектор pGEX-2T кДНК гена *Surf-6* человека (*hSurf-6*) для экспрессии hSURF-6, трансляционно слитого с глутатион-S-трансферазой, в бактериальной системе. Полученный вектор назван pGEX-2T-GST-hSurf-6. На основе штамма *Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL получен суперпродукцент химерного белка GST-hSURF-6, выделение и очистку которого производили методом аффинной хроматографии на L-глутатион-сефарозе. В оптимизированных условиях доля рекомбинантного GST-hSURF-6 составляла не менее 15% от суммарного бактериального белка, а из 1 л культуры штамма-продукента выделялось до 7 мг белка. Конечная фракция элюата содержала около 80% GST-hSURF-6. Количество и чистота выделенного белка достаточны для иммунизации животных и получения антител. Белок GST-hSURF-6 может быть также использован в качестве аффинного лиганда для выявления белковых партнеров hSURF-6 в клетках человека.

Согласно последним данным протеомного анализа, ядрышки клеток человека содержат около 4000 белков, значительная часть которых необходима для осуществления основной функции ядрышка — синтеза рибосом [1–7]. Однако около трети белков, выявляемых в составе выделенных ядрышек, изучены недостаточно, а их роль в клеточном метаболизме до сих пор остается невыясненной. К таким белкам относится, в частности, белок SURF-6.

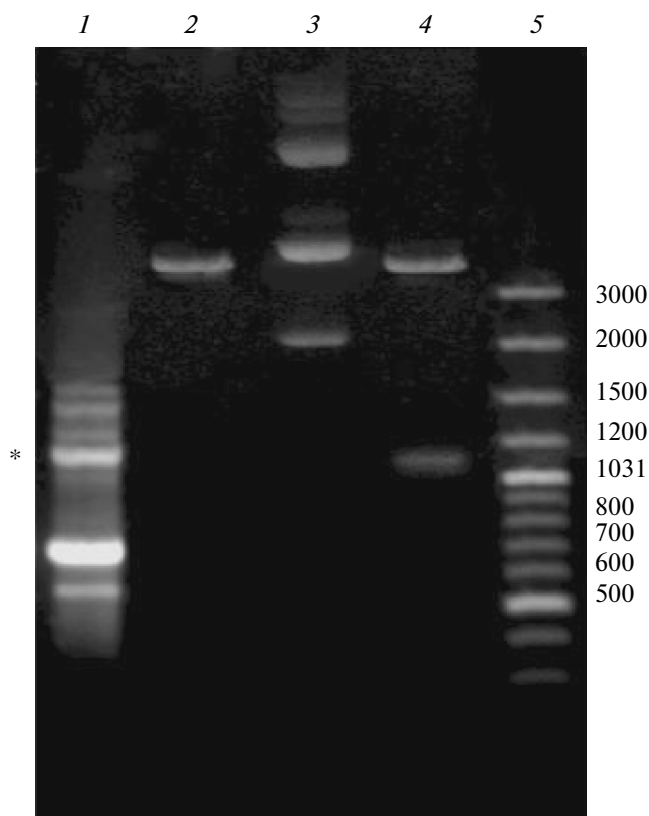
SURF-6 впервые описан в 1996 г. как продукт экспрессии гена *Surf-6*, являющегося шестым членом локуса *Surfeit* в геноме мыши *Mus musculus* [8]. Позднее его ортологи обнаружены у представителей других таксономических групп от дрожжей до человека [9, 10]. На сегодняшний день наиболее хорошо изучен SURF-6 мыши. Доказано, что он является жизненно необходимым белком, пост-транскрипционный нокдаун которого приводит к гибели соматических и эмбриональных клеток [11, 12]. Специфическая локализация в ядрышках и связь с ядрышковой РНК предполагают участие SURF-6 мыши в биогенезе рибосом [13], а увеличение содержания SURF-6 в фибробластах и лимфоцитах мыши, активированных к пролиферации [14], указывает на участие SURF-6 в процессах клеточной пролиферации. В совокупности, описанные свойства свидетельствуют в пользу многофункциональности SURF-6 мыши и, возможно, его гомолога, белка hSURF-6, у человека. Ген *Surf-6* человека и продукт его экспрессии — hSURF-6 (361 аминокислотных остатков) описаны в 2000 г. [9], однако, функции SURF-6 человека на сегодняшний день практически не изучались.

Цель данной работы — клонирование, экспрессия в бактериальной системе (*Escherichia coli*) и выделение рекомбинантного белка GST-hSURF-6 для получения специфических антител к SURF-6 человека.

### МЕТОДИКА

**Клеточные культуры.** Клетки человека линии HeLa приобретены в Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки выращивали в среде DMEM (“ПанЭко”, Россия), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (“Нуклон”, США), 2 mM L-глутамин, антибиотики пенициллин и стрептомицин (по 250 ед./л каждого), при 37°C и в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

**Клонирование полноразмерной кДНК гена *Surf-6* человека.** Для клонирования кДНК гена *Surf-6* человека был выбран вектор pGEX-2T, позволяющий экспрессировать целевой ген под контролем индуцибельного *tac*-промотора. Последовательность кДНК *Surf-6* человека получена из [9]. Суммарную РНК выделяли из клеток HeLa (10<sup>6</sup>) с помощью набора RNeasy Mini Kit (“Qiagen”, США), следуя рекомендациям производителя. Выделенную РНК использовали в качестве матрицы для синтеза первой цепи кДНК *hSurf-6* методом обратной транскрипции с помощью обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей M-MLV (“Promega”, США) и oligo(dT)<sub>18</sub> праймеров. кДНК *hSurf-6* амплифицировали с помощью ПЦР, используя специфические праймеры к гену *hSurf-6*: 5'-cgggaattctgatggcctctctactcgcgaaggac (сайт рестрикции EcoRI подчеркнут)



**Рис. 1.** Электрофореграммы продуктов ПЦР с кДНК SURF-6 человека (1), вектора pGEX-2T, обработанного эндонуклеазами EcoRI и BamHI (2), вектора pGEX-2T-GST-hSurf-6 (3) и продуктов его рестрикции эндонуклеазами EcoRI и BamHI (4); 5 – маркеры (цифрами указаны п.н.). Звездочкой обозначен фрагмент, подвижность которого соответствует подвижности кДНК *Surf-6* человека (1086 п.н.).

и 3'-gcgggaccctcagaccaggcctgcgcgctccag (сайт рестрикции BamHI подчеркнут). Амплификацию производили на амплификаторе "Терцик" ("ДНК-технология", Россия) в следующем режиме: денатурация при 94°C 3 мин, затем 40 циклов по 45 с при 94°C, 45 с при 65°C и 1 мин при 72°C, общая элонгация продолжалась 3 мин при 72°C. Продукты ПЦР разделяли методом гель-электрофореза в стандартных условиях. ДНК, соответствующую расчетной подвижности кДНК *hSurf-6* (1086 п.н.), вырезали из геля и очищали с помощью набора для очистки ДНК Whizard SV Gel and PCR Clean-Up System ("Promega", США). Амплификат и вектор pGEX-2T ("GE Healthcare", Великобритания) обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BamHI и EcoRI ("Promega", США), очищали с помощью набора Whizard SV Gel and PCR Clean-Up System ("Promega", США) и лигировали ДНК-лигазой T4 в молярном соотношении 1 : 1 ("Promega", США). Продукт лигирования трансформировали в клетки *Escherichia coli* штамма XL-1 Blue ("Stratagene", США) по стандартной методике [15]. Клетки высевали на LB-агар с ампицил-

лином (100 мкг/мл) и инкубировали при 37°C в течение 16 ч. Из нескольких выросших колоний выделяли плазмидную ДНК с помощью набора Whizard Plus SV Minipreps DNA purification System ("Promega", США). Наличие вставки в клонах, соответствующей по размеру кДНК *hSurf-6*, определяли гидролизом эндонуклеазами рестрикции EcoRI и BamHI. Плазмиды, предположительно содержащие вставку *hSurf-6*, затем подвергали секвенированию с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 и автоматического секвенатора ДНК ABI PRISM 3730 ("Applied Biosystems", США).

**Экспрессия и выделение рекомбинантного белка GST-hSURF-6.** Клетки *E. coli* штамма BL21-Codon-Plus(DE3)-RIL ("Stratagene", США) трансформировали плазмидой pGEX-2T-GST-hSurf-6 и высевали на чашки Петри по стандартной методике. Отдельную колонию с чашки пересевали в 10 мл среды LB [15], содержащей 100 мкг/мл ампициллина, с последующей инкубацией в течение ночи с горизонтальным перемешиванием (250 об/мин) при 37°C. Ночную культуру переносили в 0.5 л среды LB с ампициллином (100 мкг/мл) и выращивали до достижения оптической плотности 0.6 при 590 нм. Экспрессию GST-hSURF-6 индуцировали добавлением 0.1 мМ изопропилтиогаляктозида (ИПТГ, "Sigma", США) 3 ч при 37°C и горизонтальном перемешивании (250 об/мин). Клетки осаждали центрифугированием (1000 g, 20 мин), осадок ресуспендировали в 20 мл ледяного буфера А, содержащего 20 мМ трис-НСl (pH 7.5), 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА-Na, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ), 1 мМ дитиотреитол (ДТТ), коктейль протеазных ингибиторов ("Sigma", США). Для уменьшения протеолитической деградации белка все этапы выделения проводили при 4°C. Все растворы для выделения содержали протеазные ингибиторы (1 мМ ФМСФ, 1 мМ ЭДТА-Na), а раствор для лизиса бактерий – коктейль протеазных ингибиторов ("Sigma", США). Клетки разрушали на льду с помощью ультразвукового дезинтегратора (20 импульсов по 1 мин каждый) и добавляли тритон X-100 до конечной концентрации 1%. Суспензию центрифугировали (12000 g, 10 мин) при 4°C, к полученному супернатанту добавляли NaCl до конечной концентрации 0.5 М и 1 мл L-глутатион-сефарозы 4В ("GE Healthcare", Великобритания), предварительно уравновешенной буфером А, содержащим 0.5 М NaCl и 1% тритона X-100, и инкубировали 30 мин с интенсивным перемешиванием при 4°C. Суспензию переносили в колонку и промывали последовательно 100 мл буфера В, содержащим 20 мМ трис-НСl (pH 7.5), 1 М NaCl, 1% тритона X-100, 1 мМ ЭДТА-Na, 1 мМ ФМСФ, 1 мМ ДТТ, 100 мл буфера В без NaCl, 100 мл буфера В без NaCl и без тритона X-100. Все операции производили при 4°C. Белок элюировали 5 мл буфера С, содержащим 20 мМ трис-НСl (pH 8.0), 20 мМ L-глутатион, 1 М NaCl, 1% тритон X-100, 1 мМ ЭДТА-Na, 1 мМ ФМСФ, 1 мМ

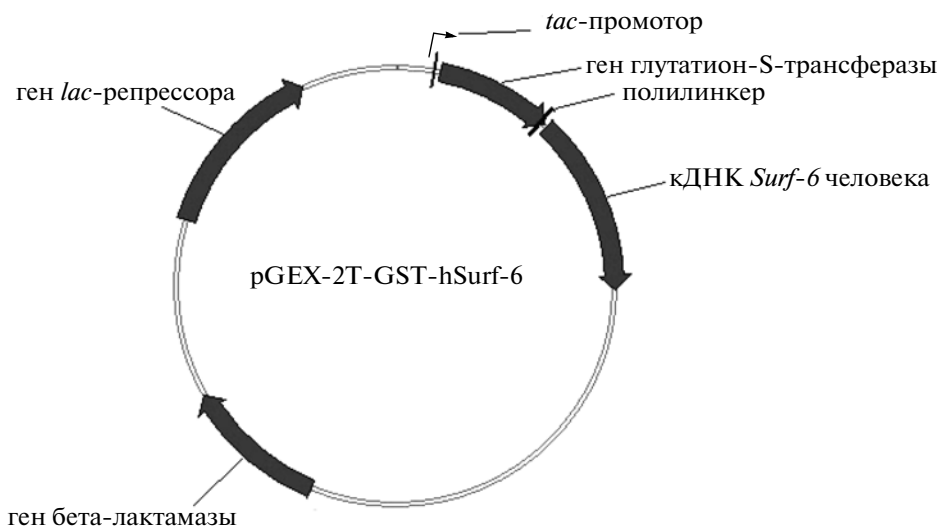


Рис. 2. Схема полученного вектора pGEX-2T-GST-hSurf-6 с указанием основных функциональных элементов.

ДТТ. Собирали фракции по 1 мл и анализировали их электрофорезом в 12%-ном ПААГ, содержащим 0.1% ДДС-Na [16].

**Иммуноблоттинг.** Фракции, полученные после элюции, разделяли электрофорезом в 12%-ном ПААГ [16]. На каждую дорожку наносили не более 10 мкг суммарного белка. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в камере для полусухого переноса ("Bio-Rad", Великобритания). Перед переносом гель и мембрану инкубировали 30 мин в буфере, содержащем 48 мМ трис (рН 8.3), 39 мМ глицин, 20% метанола, 0.0385% ДДС-Na. Перенос белков из геля на мембрану проводили при постоянном напряжении 25 В в течение 1 ч. Мембрану инкубировали в 5%-ном растворе обезжиренного молока в буфере TBS-T, содержащем 20 мМ трис-HCl (рН 7.6), 150 мМ NaCl, 0.05% твин-20, в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем мембрану инкубировали с поликлональными антителами к белку SURF-6 мыши [8] в разведении 1 : 500 в течение 1 ч, 40 мин с антителами к иммуноглобулинам кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена ("Jackson ImmunoResearch Laboratories", США), в разведении 1 : 15000 в буфере TBS-T. После двукратной отмывки в буфере TBS-T мембрану проявляли с помощью набора ECL+Plus Detection Kit ("GE Healthcare", Великобритания).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Клонирование кДНК *Surf-6* человека и создание вектора pGEX-2T-GST-hSurf-6.** Результаты ПЦР кДНК *Surf-6* представлены на рис. 1 (дорожка 1). Кроме целевого продукта, размером около 1086 п.н., на дорожке присутствовали несколько дополнительных продуктов размером от 300 до 2500 п.н. Наличие нескольких продуктов амплификации можно

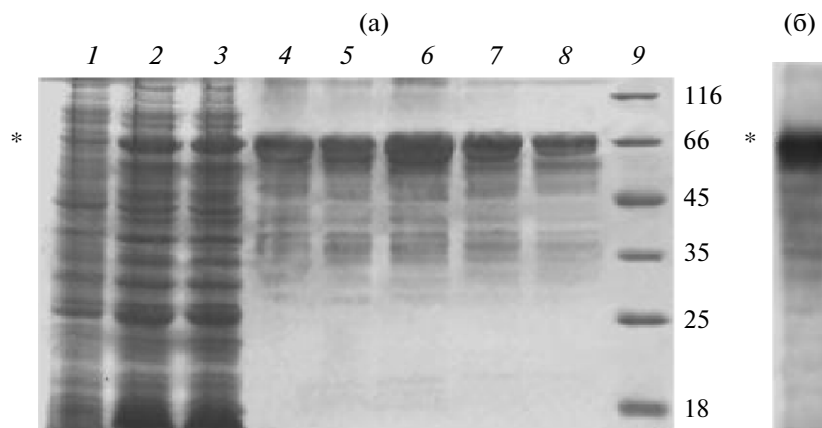
объяснить тем, что при ПЦР специфические праймеры, помимо кДНК целевого гена могут отжигаться на другие последовательности ДНК, присутствующие в образце. Так, обратный праймер (3' → 5'), комплементарный 3'-концу последовательности кДНК *Surf-6* человека, имеет некоторую гомологию к двум внутренним участкам кДНК *Surf-6*, что может объяснить появление продуктов ПЦР размером 500–700 п.н. (рис. 1, дорожка 1). ДНК, соответствующая расчетному размеру полноразмерной кДНК *Surf-6* человека (1086 п.н.), была очищена и подвергнута гидролизу эндонуклеазами рестрикции EcoRI и BamHI. Аналогичному расщеплению подвергали также вектор pGEX-2T.

Очищенный ПЦР-продукт и гидролизованный вектор pGEX-2T (рис. 1, дорожка 2) были лигированы. Продукт лигазной реакции был трансформирован в штамм бактерий XL-1 Blue для последующего клонирования. Плазмиды, выделенные из полученных клонов, проверены рестриктным анализом на наличие вставки, соответствующей по размеру кДНК *Surf-6* (рис. 1, дорожка 4).

ДНК положительных клонов была подвергнута секвенированию, результаты которого показали, что последовательность клонированной кДНК полностью соответствует кодирующей последовательности гена *Surf-6* человека, известной из литературы [9].

Вектор, содержащий последовательность кДНК *Surf-6* человека, слитую с геном GST, созданный в работе, назван pGEX-2T-GST-hSurf-6 (рис. 1, дорожка 3, рис. 2).

**Получение бактериального штамма—суперпродукента гибридного белка GST-hSURF-6.** Открытая рамка считывания *Surf-6* человека содержит редкие для *E. coli* кодоны — 10 кодонов АГГ и 1 кодон АГА (оба кодона кодируют остаток аргинина), которые могут быть причиной неполной трансляции белка в



**Рис. 3.** Анализ экспрессии GST-hSURF-6 в *E. coli* и его очистка с помощью хроматографии; а – электрофореграмма в 12%-ном ПААГ: 1 – суммарный лизат неиндуцированной культуры бактерий; 2 – лизат культуры через 3 ч после индукции ИПТГ; 3 – осветленный лизат индуцированной культуры; 4–8 – пять последовательных фракций, полученных в ходе хроматографической элюции GST-hSURF-6, 9 – маркеры молекулярных весов; б – иммуноблоттинг пятой фракции белка GST-hSURF-6, полученный с использованием антител к SURF-6 [8]. Положение GST-hSURF-6 указано звездочками.

бактериях. Поэтому для экспрессии плазмиды pGEX-2T-GST-hSurf-6 был выбран бактериальный штамм BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Этот штамм содержит плазмиду с заклонированными последовательностями транспортной РНК для аргинина, лейцина, изолейцина, что облегчает экспрессию генов, содержащих такие кодоны. Кроме того, штаммы серии BL-21 характеризуются низким уровнем экспрессии протеаз, а их геномы содержат ген *lacI*, экспрессирующий *lac*-репрессор, снижающий фоновую активность *lac*-промотора.

Индукцию экспрессии белка GST-hSURF-6 вызывали с помощью 0.1 мМ ИПТГ при оптической плотности культуры  $D_{590}$  0.6 и последующей инкубации культуры при 37°C в течение 3 ч. Время индукции синтеза белка более 3–4 ч не приводило к увеличению продукции белка (не иллюстрировано). Экспрессия GST-hSURF-6 не вызвала гибели бактериальной культуры, что указывает на сниженную токсичность химерного белка в штамме BL21-CodonPlus(DE3)-RIL.

На рис. 3а показано, что белок GST-hSURF-6 имеет электрофоретическую подвижность около 66 кДа, что соответствует расчетной молекулярной массе белка GST-hSURF-6, равной 65 кДа. Анализ отсканированного изображения геля, приведенного на рис. 3, с помощью программы Scion Image, версия 4.0.3.2 (“Scion Corporation”, США), показал, что доля белка GST-hSURF-6 составляла 15–20% от суммарного белка штамма–продукента. Большая часть экспрессируемого белка содержалась в надосадочной жидкости после центрифугирования лизата клеток при 16000 г в течение 10 мин, т.е. его осветления. На основании этого мы сделали вывод, что химерный белок GST-SURF-6 не образовывал тельца

включения в клетках бактерий и являлся растворимым (рис. 3).

**Выделение и очистка гибридного белка GST-hSURF-6.** Клетки бактерий разрушали ультразвуковой дезинтеграцией на льду. Для повышения растворимости рекомбинантного белка к лизату добавляли 1% неионного детергента тритон X-100 и освобождали от клеточного дебриса (осветляли) центрифугированием при 16000 г 10 мин. GST-hSURF-6 из осветленного лизата очищали с помощью аффинной хроматографии на носителе – L-глутатион-сефарозе, обладающей повышенным сродством к GST. Для оптимизации условий выделения GST-hSURF-6 в процедуру хроматографической очистки на L-глутатион-сефарозе, рекомендуемой производителем (“GE Healthcare”, Великобритания), внесли ряд модификаций. Так, подобрано оптимальное время связывания белка с носителем, которое составило 30 мин. При увеличении времени инкубации до 2 ч возникали трудности с элюцией белка, а при уменьшении – белок связывался с носителем лишь частично. Для повышения эффективности элюции концентрация L-глутатиона в буфере для элюции повышена с 5 до 20 мМ. Кроме того, для уменьшения неспецифического связывания GST-hSURF-6 с носителем в элюирующий буфер добавляли NaCl до конечной концентрации 1 М и тритон X-100 до концентрации 1%. Оптимальный объем элюирующего буфера составлял 5 мл.

При перечисленных выше условиях общий выход GST-hSURF-6 составлял 7 мг белка из 1 л бактериальной культуры. Выделенный белок узнавался поликлональными антителами к SURF-6 [8] на иммуноблотах (рис. 3б). Белковые полосы меньшей молекулярной массы, присутствующие на дорожке, скорее всего являются фрагментами белка, возника-

ющими в результате неполной трансляции рекомбинантного белка в бактериях, но не являются продуктами его деградации, возникающими при выделении. Так, понижение температуры инкубации бактерий до 30°C, позволяющее существенно снизить протеолиз экспрессируемых белков в *E. coli*, и добавление ингибиторов протеаз к культивируемым бактериям и используемым при выделении растворам не приводило к исчезновению минорных полос, распознаваемых антителами к SURF-6. Тем не менее, содержание полноразмерного GST-hSURF-6 в образцах после выделения составляло не менее 80%.

В полипептидной цепи SURF-6 человека присутствуют сайты расщепления тромбином. Это не позволило нам произвести отщепление глутатион-S-трансферазы от белка SURF-6 тромбином. Однако условия экспрессии и очистки белка GST-hSURF-6 позволяют выделить его в количествах, достаточных для иммунизации животных с целью получения антител к SURF-6 человека, а также для использования в качестве аффинного лиганда в экспериментах по выявлению белковых партнеров hSURF-6 человека.

Работа финансировалась Российским фондом фундаментальных исследований (грант 07-04-00401).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carmo-Fonseca M., Mendes-Soares L., Campos I. // Nat. Cell Biol. 2000 V. 2. № 6. P. 107–112.
2. Scherl A., Coutü Y., Düon C., Callü A., Kindbeiter K., Sanchez J.C., Greco A., Hochstrasser D., Diaz J.J. // Mol. Biol. Cell. 2002. V. 13. № 11. P. 4100–4109.
3. Bernardi R., Pandolfi P.P. // Nat. Med. 2003. V. 9. № 1. P. 24–25.
4. Olson M.O. // Sci. Signalling. 2004. V. 2004. № 224. P. 10.
5. Andersen J.S., Lam Y.W., Leung A.K., Ong S.E., Lyon C.E., Lamond A.I., Mann M. // Nature. 2005. V. 6. № 433. P. 77–83.
6. Ahmad Y., Boisvert F.M., Gregor P., Cobley A., Lamond A.I. // Nucl. Acids Res. 2009. V. 37. P. 181–184.
7. Boisvert F.M., Lam Y.W., Lamont D., Lamond A.I. // Mol. Cell Proteomics. 2010. V. 9. № 3. P. 457–470.
8. Magoulas C., Fried M. // DNA Cell Biol. 1996. V. 15. № 4. P. 305–316.
9. Magoulas C., Fried M. // Gene. 2000. V. 243. P. 115–123.
10. Polzиков М., Затsepина О., Магоулас С. // Biochem. Biophys. Res. Comm. 2005. V. 327. P. 143–149.
11. Romanova L.G., Anger M., Zatsepina O.V., Schultz R.M. // Biol. Reproduction. 2006. V. 75. P. 690–696.
12. Polzиков М.А., Магоулас С., Затsepина О.В. // Mol. Biol. Rep. 2007. V. 34. № 3. P. 155–160.
13. Гурченков В.В., Ползиков М.А., Магоулас К., Романова Л.Г., Зацепина О.В. // Биоорг. химия. 2005. Т. 31. № 6. С. 578–585.
14. Моралева А.А., Малышева М.В., Магоулас Х., Ползиков М.А., Зацепина О.В. // Бюлл. эксп. биол. мед. 2009. Т. 147. № 5. С. 578–582.
15. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
16. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

## Cloning, Expression, and Isolation from *Escherichia coli* of Human Protein SURF-6 Translationally Fused to Glutathione S-transferase

M. Yu. Kordyukova, O. V. Zatsepina, and M. A. Polzikov

Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

e-mail: zatsepina\_olga@mail.ru

Received July 20, 2010

**Abstract**—cDNA of human gene *Surf-6* (*hSutf-6*) was amplified and cloned into vector pGEX-2T for the expression in the bacterial system of protein hSURF-6 translationally fused to glutathione S-transferase. The resulting vector is named as pGEX-2T-GST-hSurf-6. Superproducer of chimeric protein GST-hSURF-6 was obtained on the basis of *Escherichia coli* strain BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Its purification was performed by the affinity chromatography on L-glutathione-sepharose. The proportion of recombinant protein GST-hSURF-6 in the optimized conditions was not less than 15% of the total bacterial protein, and up to 7 mg of the protein was isolated from 1 liter of culture of the producer strain. The final fraction of eluate contained approximately 80% of GST-hSURF-6. The amount and the purity of the isolated protein were sufficient to immunize animals and obtain antibodies. Protein GST-hSURF-6 can also be used as an affinity ligand for revealing protein partners of hSURF-6 in human cells.