

УДК 577.218

КЛОНИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *EcCspA* И ОЧИСТКА КОДИРУЕМОГО ИМ БЕЛКА

А.С. Низкородова, Е.В. Полянская, А.М. Смагулова, Б.К. Искаков

*Институт Молекулярной Биологии и Биохимии им. М.А. Айтхожина, г. Алматы, Казахстан
anna_niz@mail.ru*

Белки холодового шока (БХШ) синтезируются в клетках всех известных живых организмов в ответ на понижение температуры и способствуют адаптации клеток к холодному стрессу. БХШ способны связываться с одноцепочечными нуклеиновыми кислотами, для некоторых из БХШ показана РНК-шаперонная активность. Механизм действия этих белков во время холодового стресса до конца не ясен: предполагается, что белки холодового шока способны как ингибировать синтез большинства клеточных белков путём неспецифического связывания с их мРНК, так и дестабилизировать вторичные структуры в РНК, возникающие при понижении температуры и препятствующие их трансляции. Для определения функций БХШ в клетках необходимы *in vitro* исследования, что предполагает наличие высокоочищенных и функционально активных белков холодового шока. Имеющиеся на данный момент методики выделения и очистки БХШ многостадийны, дороги и занимают длительное время. В данной работе представлена одностадийная методика очистки БХШ на примере белка *EcCSPA E.coli*. Методика основана на применении аффинной хроматографии с использованием коммерческой агарозы, модифицированной никель-нитрилотриацетатом, способным специфично связывать достаточно протяжённые последовательности пептидов, состоящих из гистидина (His-tag). Весь процесс очистки белка – начиная с экспрессии в бактериальной суспензии и до получения готового к использованию препарата нативного белка, занимает один рабочий день. В результате применения разработанной методики был получен препарат нативного белка *EcCSPA* с чистотой 92,8% и выходом 2,9 г на литр исходной суспензии бактериальных клеток.

Ключевые слова: белки холодового шока (БХШ), *EcCSPA*, Ni-NTA агароза.

ВВЕДЕНИЕ

Белки холодового шока (БХШ) обнаружены во всех группах живых существ, эти белки обладают гомологичной структурой и сходными функциями – БХШ участвуют в ряде важных процессов, связанных с механизмом адаптации к стрессовым условиям среды, в частности, к холодному шоку [1, 2]. Понижение температуры приводит к ингибированию роста и пролиферации клеток, на молекулярном уровне это выражается в ингибировании синтеза большинства клеточных белков и одновременным усилением экспрессии пула специфических белков, названных белками холодового шока [3, 4].

Известно, что БХШ способны связываться с одноцепочечными нуклеиновыми кислотами [1, 3-5], причём для некоторых из этих белков была показана РНК-шаперонная активность [1, 6], то есть способность дестабилизировать вторичные структуры, возникающие в одноцепочечных РНК, в частности, под действием холода. В настоящее время существуют две точки зрения на физиологическую функциональность БХШ во время холодового стресса. Первая гипотеза предполагает участие БХШ в блокировании трансляции большинства клеточных белков путём неспецифического связывания БХШ с их мРНК [3, 4]. Вторая гипотеза исходит из РНК-шаперонной активности БХШ, установленной для некоторых из этих белков [1, 2], и заключается в том, что БХШ способны дестабилизировать вторичные структуры в мРНК, препятствующие трансляции этих мРНК [1, 2, 7, 8]. Для определения функций БХШ в клетках необходимы дальнейшие исследования, по большей части *in vitro*, что предполагает наличие высокоочищенных и функциональных белков холодового шока.

Имеющиеся на настоящий момент методики очистки белков холодового шока многостадийны, довольно дороги и занимают много времени. Стандартная методика заключается в проведении ионно-обменной хроматографии с последующим диализом, осаждением сульфатом аммония, очередным диализом и завершающей стадией либо гель-фильтрации [7, 9], либо хроматографии на гидроксипатитовой колонке [10]. Причём в зависимости от характерных особенностей выделяемого белка могут добавляться дополнительные стадии очистки, как-то: повторная очистка на ионно-обменной колонке [11], промежуточная очистка на гепариновой колонке [10], либо предварительное высаливание сульфатом

аммония грубого лизата [9]. Таким образом, стандартная процедура выделения БХШ занимает от 2-х до 3-х суток [7, 9-11].

Задачей данного исследования была разработка простой, дешёвой и быстрой методики получения в лабораторных условиях препаратов нативных чистых БХШ, на примере белка холодового шока EcCSPA. Нами была разработана одностадийная методика очистки БХШ, дающая на выходе достаточное количество высокоочищенного белка. Методика базируется на применении аффинной хроматографии, основанной на использовании коммерческой агарозы, модифицированной Ni-нитрилотриацетатом, способным специфично связывать достаточно протяжённые последовательности пептидов, состоящих из гистидиновой аминокислоты (не менее 4-х аминокислотных остатков). В результате применения разработанной методики был получен препарат белка EcCSPA с чистотой 92,8% и выходом 2,9 г на литр исходной суспензии бактериальных клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение плазмид. Последовательность гена *EcCspA* была клонирована в экспрессионный вектор pQE-30 (“QIAGEN”) по сайтам эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Sal*I таким образом, чтобы на N-конце белка EcCSPA при экспрессии синтезировалась последовательность гекса-His-tag. Экспрессия гена была поставлена под контроль T5-промотора и терминатора транскрипции и последовательности Шайн-Далгарно.

Экспрессия и очистка белка. Экспрессия белка осуществлялась в клетках *E.coli* штамма M15 в 200 мл среды Луриа-Бертани, содержащей 100 мкг/л ампициллина и 25 мкг/л карбенициллина при +37°C, 150 rpm в течение 5 часов. Индукция экспрессии осуществлялась добавлением в питательную среду 1 mM IPTG. Очистка белка производилась на Ni-NTA-агарозу (“5PRIME”). По достижении клеточной суспензией оптической плотности $OD_{600} = 1$ клетки осаждали центрифугированием (5 мин на 5000 g при +4°C) и ресуспендировали в лизисном буфере (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM имидазол, 1 мг/мл лизоцим, 100 мкг/мл PMSF, pH = 8,0) в отношении 1:5 к клеточному осадку. Лизис клеточной стенки проводился во льду в течение 30 мин с последующей обработкой ультразвуком в ледяной ультразвуковой бане (70 Вт в течение 7 мин). Клеточный дебрис осаждали центрифугированием 30 мин на 15000 g при +4°C [12]. Очистку белка на Ni-NTA-агарозе осуществляли согласно рекомендациям [13, 14], все операции проводились при +10°C. Связывание белка с Ni-NTA-агарозой (Ni-NTA-агарозы по отношению к лизату брали как 1:5) проводили при аккуратном перемешивании в течение часа. Промывку колонки осуществляли трижды промывочным буфером (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 20 mM имидазол, pH = 8,0). Элюцию белка с колонки проводили ступенчато 0,5 объёмами буфера (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 300 mM имидазол, pH = 8,0) от начально взятого объёма Ni-NTA-агарозы.

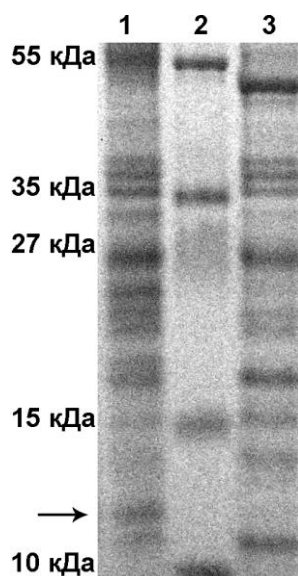
Концентрирование белка. Элюаты белка были объединены и сконцентрированы на центрифужных колонках VIVASPIN 2 с отсечкой 10,000 MWCO (“Vivascience Sartorius group”) согласно инструкции производителя.

Белковый электрофорез и иммунодетекция. Денатурирующий белковый электрофорез проводился в трис-трициновой системе согласно [15] при концентрации геля 11%T и 3%C. Окраска гелей осуществлялась Page Blue Protein Staining Solution (“Fermentas”) согласно инструкции производителя. Перенос белков и последующая детекция проводились на PVDF-мембране с использованием коммерческих антител anti-His HPR Conjugate (“5PRIME”) согласно инструкции производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

EcCSPA является основным и наиболее исследованным холод-индуцибельным белком *E.coli* [2-8]. EcCSPA состоит из 70 аминокислот и образован пятью антипараллельными β -листами; в составе белка имеется два РНК-связывающих мотива RNP1 (Phe¹⁸-Gly¹⁹-Phe²⁰) и RNP2 (Phe³¹-Val³²-His³³), достаточно протяжённые гистидиновые мотивы отсутствуют [2, 3, 7]. На первом этапе работы была получена экспрессионная конструкция на основе плазмиды pQE-30, с которой мог быть экспрессирован белок EcCSPA, содержащий на N-конце последовательность из шести остатков гистидина.

Экспрессия белка EcCSPA проводилась согласно рекомендациям *Hofweber u др.* [4], разработавших протоколы для экспрессии холодовошоковых бактериальных белков, что в случае с EcCSPA давало средний выход целевого белка (рисунок 1).

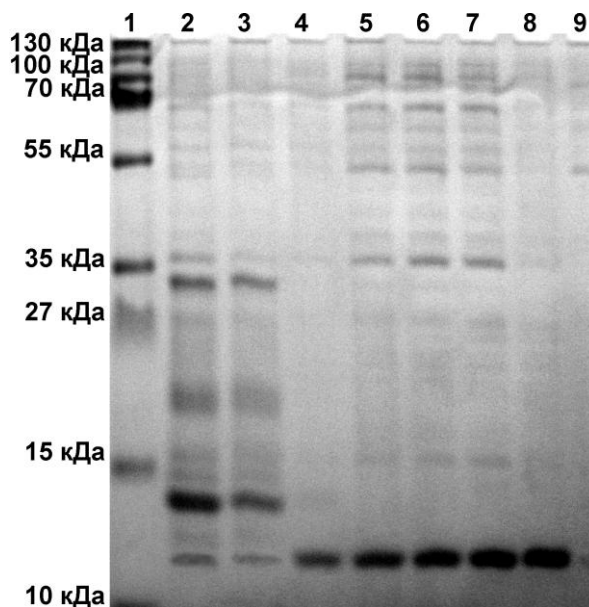


Дорожки: 1 – тотальный белок клеток, индуцированных 1 мМ IPTG в течение 3-х часов; 2 – белковый маркер Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus (“Fermentas”); 3 – тотальный белок клеток, не подвергнутых индукции. Стрелкой обозначен целевой белок EcCSPA.

Рис. 1. Экспрессия белка EcCSPA в клетках *E.coli* M15 на электрофореграмме 10% ПААГ

Поскольку задачей исследования было выделение белка EcCSPA в нативной форме, то лизис клеток и последующие стадии очистки белка проводились в мягких условиях без добавления денатурирующих агентов.

После лизиса клеток в качестве альтернативы ультразвуковому гомогенизатору проводилась обработка ультразвуком в бытовой ультразвуковой бане и, несмотря на маломощность последней (70 Вт), разрушение клеток происходило более полно (рисунок 2).

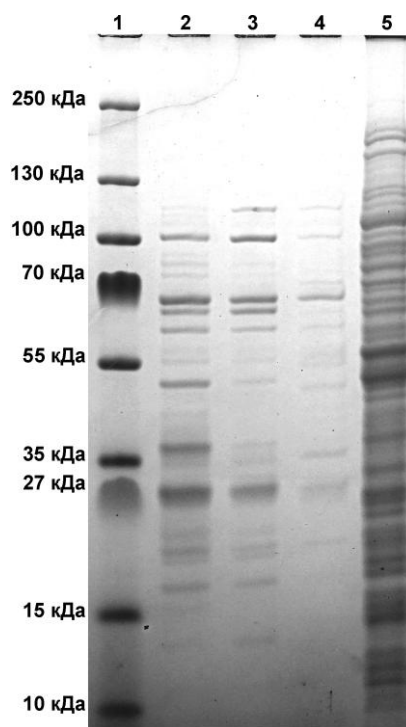


Дорожки: 1 – белковый маркер Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus (“Fermentas”); 2 – препарат растворимого клеточного белка (с обработкой ультразвуком); 3 – препарат растворимого клеточного белка (без обработки ультразвуком); 4-9 – препараты элюированных с Ni²⁺-NTA-агарозы белков (смывы с 1-го по 6-й соответственно).

Рис. 2. Стадии отчистки EcCSPA на электрофореграмме 10% ПААГ

Очищенный от клеточного дебриса лизат инкубировали с Ni-NTA-агарозой, предварительно отмытой бидистиллированной водой и уравновешенной лизисным буфером. После часового связывания с Ni-NTA-

агарозой во фракции белков, не связавшейся с ней, целевой белок не детектировался. Также не обнаруживался EcCSPA в препаратах белков, смытых с колонки отмывочным буфером (рисунок 3). Таким образом, можно констатировать, что белок EcCSPA относится к тому типу белков, которые хорошо связываются с Ni-NTA-агарозой в нативных условиях.



Дорожки: 1 – белковый маркер Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus (“Fermentas”); 2-4 – препараты белков, смытых с колонки после промывки 20 мМ имидазолом (1-й, 2-й и 3-й соответственно); 5 – препарат белков, не связавшихся с Ni-NTA-агарозой.

Рис. 3. Промежуточные стадии очистки EcCSPA на электрофореграмме градиентного 4-16% ПААГ

Связавшийся белок смывали с Ni-NTA-агарозы ступенчато – по 0,5 объема элюационного буфера от изначально взятого объема агарозы, таким образом, концентрация имидазола повышалась от 150 мМ в первом элюате до ~300 мМ в шестом. Результаты элюции показаны на рисунке 2. Как видно по электрофореграмме, белок EcCSPA элюируется начиная с 1-го смыва, достигает максимума в 4-м и 5-м смывах, а в 6-м смыве присутствует в остаточном количестве.

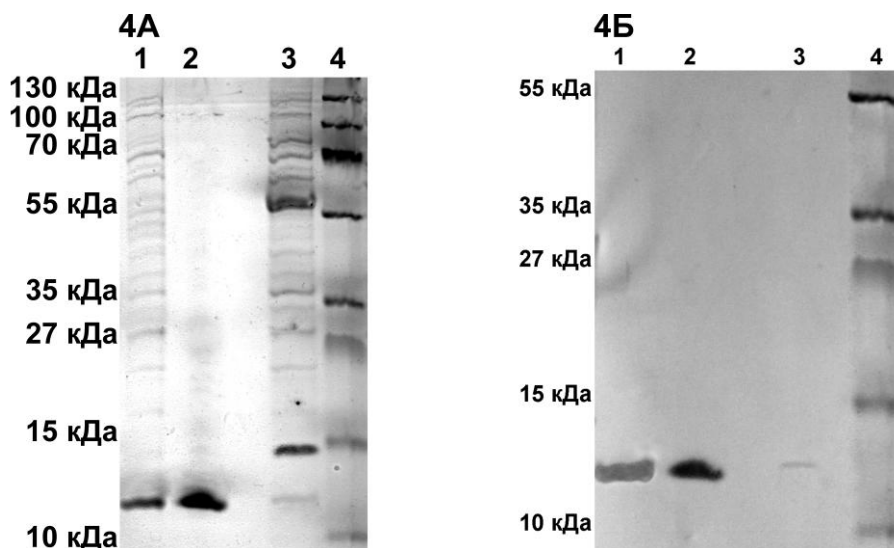
Для получения препаратов чистого белка были отдельно объединены: 1-я и 5-я фракции; 2-я, 3-я и 4-я фракции. Полученные объединённые препараты белка, а также 6-я фракция были сконцентрированы посредством ультрацентрифугирования на колонках VIVASPIN 2 с отсечкой 10,000 MWCO (“Vivascience Sartorius group”). Также в процессе ультрацентрифугирования происходило избавление от имидазола, что является более быстрым методом по сравнению со стандартным диализом. Препараты белка были сконцентрированы в 4 раза.

Полученные концентрированные препараты белка EcCSPA были проверены на чистоту на градиентном 4-16% ПААГ; гель, окрашенный G250, показан на рисунке 4А. По данной электрофореграмме (а также по электрофореграмме на рисунке 2) был проведён денсиметрический анализ в программе ImageJ 1.42q (Wayne Rasband National Institute of Health, USA). С помощью данной программы было подсчитано процентное содержание целевого белка к общему количеству белка в препарате. Было установлено, что чистота полученных препаратов EcCSPA составляет: 45,3% – для препарата фракций 2, 3 и 4; 92,8% – для препарата фракций 1 и 5; 4,91% – для препарата фракции 6. Исходное количество белка EcCSPA после лизиса клеток (рисунок 2, дорожка 2) составляло 5,62%, то есть количество белка в последней из полученных фракций было даже меньше начального. Таким образом, путём одноступенчатой очистки на Ni-NTA-агарозе удалось обогатить белковую фракцию белка EcCSPA в 16,5 раз для наиболее концентрированного препарата (объединяющего фракции 1-ю и 5-ю и имеющего чистоту 92,8%).

Для обнаружения возможной деградации белка EcCSPA в процессе очистки и концентрирования был проведён Вестерн-блот анализ. Поскольку небольшое количество деградировавшего белка невозможно детектировать визуально при окрашивании ПААГ, был использован гораздо более чувствительный метод иммунодетекции с использованием коммерческих антител на гистидиновую последовательность (рисунок

4Б). Шмера пептидов с меньшей электрофоретической подвижностью обнаружено не было, то есть деградации белка во время очистки и концентрирования по описанной методике не происходило.

В результате проведённой очистки белка был получен препарат EcCSPA с чистотой 92,8% и концентрацией 2,3 мкг/мкл; общий объём полученного препарата составлял 250 мкл. Таким образом, из 200 мл исходной культуры клеток было получено 575 мкг высокоочищенного белка, а также 2,15 г препарата белка грубой очистки (чистота 45,3%), который может быть подвергнут повторной очистке по той же методике. Вся методика получения и очистки белка, включая стадию экспрессии белка (3-5 часов), занимает один рабочий день. Используемая Ni-NTA агароза может использоваться повторно после проведения процедуры регенерации и перезарядки ионами Ni²⁺.



А) Электрофореграмма градиентного 4-16% ПААГ; Б) Иммунодетекция белка EcCSPA на PVDF-мембране. Дорожки: 1 – концентрированный препарат 2-го, 3-го и 4-го элюатов; 2 – концентрированный препарат 1-го и 5-го элюатов; 3 – концентрированный препарат 6-го элюата; 4 – белковый маркер Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus (“Fermentas”).

Рис. 4. Препараты концентрированного белка EcCSPA

ВЫВОДЫ

Была разработана одностадийная методика выделения и очистки БХШ на основе применения Ni-NTA агарозы. На настоящий момент разработанная методика является наиболее быстрой, дешёвой и простой. Следуя разработанной методике, в течение одного рабочего дня был получен препарат белка EcCSPA с чистотой 92,8% и выходом 2,9 г на литр исходной суспензии бактериальных клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Phadtare S., Inouye M., Severinov K. The nucleic acid melting activity of *Escherichia coli* CspE is critical for transcription antitermination and cold acclimation of cells // *The journal of biological chemistry*. – 2002. – Vol. 277(9). – P. 7239-7245.
2. Jiang W., Hou Y., Inouye M. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone // *Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – Vol. 272(1). – P. 196-202.
3. Ermolenko D.N., Makhatadze G.I. Bacterial cold-shock proteins // *CMLS*. – 2002. – Vol. 59. – P. 1902-1913.
4. Hofweber R., Horn G., Langmann T., Balbach J., Kremer W., Schmitz G., Kalbitzer H.R. The influence of cold shock proteins on transcription and translation studied in cell-free model systems // *FEBS Journal*. – 2005. – Vol. 272. – P. 4691-4702.
5. Phadtare S., Severinov K. RNA remodeling and gene regulation by cold shock proteins // *RNA Biology*. – 2010. – Vol. 7(6). – P. 788-795.
6. Phadtare S., Severinov K. Comparative analysis of changes in gene expression due to RNA melting activities of translation initiation factor IF1 and a cold shock protein of the CspA family // *Genes to Cells*. – 2009. – Vol. 14. – P. 1227-1239.
7. Bae W., Xia B., Inouye M., Severinov K. *Escherichia coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators // *PNAS*. – 2000. – Vol. 97(14). – P. 7784-7789.

8. Brandi A., Spurio R., Gualerzi C.O., Pon C.L. Massive presence of the *Escherichia coli* 'major cold-shock protein' *CspA* under non-stress conditions // *The EMBO Journal*. – 1999. – Vol. 18(6). – P. 1653-1659.
9. Schindelin H., Herrler M., Willinsky G., Marahiel M.A., Heinemann U. Overproduction, crystallization, and preliminary X-ray diffraction studies of the major cold shock protein from *Bacillus subtilis*, *CspB* // *Proteins*. – 1992. – Vol. 14. – P. 120-124.
10. Bae W., Phadtare S., Severinov K., Inouye M. Characterization of *Escherichia coli* *cspE*, whose product negatively regulates transcription of *cspA*, the gene for the major cold shock protein // *Molecular Microbiology*. – 1999. – Vol. 31. – P. 1429-1442.
11. Mayr B., Kaplan T., Lechner S., Scherer S. Identification and purification of a family of dimeric major cold shock protein homologs from the psychrotrophic *Bacillus cereus* WSBC 10201 // *Journal of Bacteriology*. – 1996. – Vol. 178(10). – P. 2916-2925.
12. Vorackova I., Suchanova S., Ulbrich P., Diehl W.E., Ruml T. Purification of proteins containing zinc finger domains using immobilized metal ion affinity chromatography // *Protein Expression and Purification*. – 2011. – Vol. 79. – P. 88-95.
13. Wingfield P.T. Preparation of soluble proteins from *Escherichia coli* // In: *Current protocols in protein science*. – 1995. – Vol. 1, New York: Wiley and Sons. – P. 6.2.1-6.2.15.
14. Gu J., Stephenson C.G., Iadarola M.J. Recombinant proteins attached to a Ni-NTA column: Use in affinity purification of antibodies // *BioTechniques*. – 1994. – Vol. 17. – P. 257-262.
15. Schägger H. Tricine-SDS-PAGE // *National Protocols*. – 2006. – Vol. 1. – P. 16-22.

ЕССРА ГЕНИН КЛОНДАУ, ЭКСПРЕССИЯЛАУ ЖӘНЕ ОЛ КОДТАЙТЫН НӘРУЫЗДЫ ТАЗАЛАУ

А.С. Низкородова, Е.В. Полянская, А.М. Смағұлова, Б.К. Исқаков

М.Ә. Айтхожин атындағы молекулалық биология және биохимия институты, Алматы, Қазақстан

ТҮЙІН

Суық шок ақуыздары (США) температураның төмендеуіне жауап ретінде барлық тірі ағзалардың жасушаларында түзіледі де, жасушалардың суық күйзеліске бейімделуіне себепші болады. США жалғыз тізбе нуклеин қышқылдарымен байланысуға қабілетті, кейбір США РНҚ-шаперондық әрекетке ие екені көрсетілді. Суық күйзеліс кезінде бұл ақуыздардың әрекет тетіктері толық түсінікті емес: суық шок ақуыздары жасушалық ақуыздардың түзілуін олардың мРНҚмен өзіндік емес байланысу арқылы да, температура төмендеу кезінде пайда болып, олардың трансляциясына кедергі келтіретін РНҚ-ның табиғи құрылымын тұрақсыздандыру арқылы да тежейді. Жасушалардағы США қызметін анықтау үшін *in vitro* зерттеулер қажет. Ол үшін өте тазаланған және әрекетті суық шок ақуыздары керек. Қазіргі США бөліп алу және тазалау әдістері көп сатылы, ұзақ уақыт алады және қымбат. Бұл жұмыста бір сатылы США тазалау тәсілі ұсынылады. Үлгі ретінде *E.coli* EcCSPA ақуызын тазалау әдісі келтірілген. Әдіс аффиндік хроматографияны қолдануға негізделген: никель-нитрилотриацетатпен өзгертілген коммерциялық агарозаны пайдалану гистидиннен (His-tag) тұратын едәуір ұзын пептидтер тізбесімен ерекше байланысады. Барлық ақуыз тазалау барысына бактериялық суспензиядағы экспрессиядан бастап пайдалануға дайын препарат алғанша бір жұмыс күні ғана кетеді. Өзірленген әдістемені қолдану нәтижесінде 92,8% тазалығы бар 2,9 г/литр бастапқы бактерия жасушалары суспензиясынан EcCSPA ақуызының препараты алынды.

Негізгі сөздер: суық шок ақуыздары (США), EcCSPA, Ni-NTA агароза.

CLONING, EXPRESSION OF EcCSPA GENE AND PURIFICATION OF ITS PROTEIN

A.S. Nizkorodova, E.V. Polyanskaya, A.M. Smagulov, B.K. Iskakov

M.A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, The Science Committee, Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, Almaty, Kazakhstan
anna_niz@mail.ru

ABSTRACT

Cold-shock proteins (CSPs) are expressed in all living cells as the part of acclimation reaction to temperature decrease. These proteins are able to bind single stranded nucleic acids; it is also shown that some of cold-shock proteins are RNA chaperons. The mechanism of action during the cold-stress for these proteins is not completely understood yet. It's thought that CSPs can inhibit expression of majority of cellular proteins via unspecific binding to their mRNAs during the cold-shock. On the other hand CSPs can act as RNA chaperons, which are thought to facilitate translation by destabilizing secondary structures occurring in mRNAs with decrease of temperature and

interfering with their translation. To define CSP's cell functions some *in vitro* experimental procedures are required, that presupposes existence of highly-purified and functionally active CSPs. Existing CSPs purification procedures are complicated, expensive and take long time. In this research we present one-stage CSP purification method, approved on EcCSPA. The procedure is based on affinity chromatography with usage of commercial nickel-nitrilotriacetate (Ni-NTA) agarose, which is able to specifically bind histidine sequences (His-tag). All protein purification procedure, including expression in bacterial cells, lasts one laboratory day. Applying this procedure for EcCSPA purification we have obtained native EcCSPA protein with purity 92,8% and concentration 2,9 g per liter of initial bacterial suspension.

Keywords: cold-shock proteins (CSP), EcCSPA, Ni-NTA agarose.