

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-136

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ ПИРОФОСФОГИДРОЛАЗЫ И РНК-ЛИГАЗЫ 1 ДЛЯ СИНТЕЗА КОЛЬЦЕВЫХ РНК

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR PRODUCING RECOMBINANT PYROPHOSPHOHYDROLASE AND RNA LIGASE 1 FOR CIRCULAR RNA SYNTHESIS

А. А. Сульгин, А. А. Вольных, Л. И. Карпенко

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

A. A. Sulgin, A. A. Volnyh, L. I. Karpenko

State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo

✉ sulgin.alexander@yandex.ru

Аннотация

В представленной работе был разработан метод получения рекомбинантных ферментов пирофосфогидролазы и T4 РНК-лигазы 1, необходимых для ферментативного синтеза кольцевых РНК *in vitro*. Была проведена оптимизация температурных условий культивирования и очистки рекомбинантных ферментов. Полученные ферменты имели высокую степень чистоты и сохраняли активность в течение длительного времени.

Abstract

In this study, a method was developed for the production of recombinant enzymes—pyrophosphohydrolase and T4 RNA ligase 1 — required for the enzymatic synthesis of circular RNAs *in vitro*. Cultivation and purification conditions were optimized to improve enzyme solubility and yield. The purified enzymes exhibited high purity and retained their activity over an extended storage period.

В настоящее время технологии РНК активно исследуются в качестве платформы для разработки средств профилактики инфекционных заболеваний. Перспективным направлением является использование кольцевых РНК. Преимуществом данной платформы по сравнению с линейной мРНК является повышенная стабильность молекулы, за счет которой достигается более продолжительная экспрессия белка, отсутствие необходимости в дополнительных модификациях нуклеотидной последовательности, а также способность кольцевых РНК активировать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ.

Одним из методов получения кольцевых РНК является лигирование линейной РНК ферментативным методом. Первым этапом в данном методе получения кРНК является синтез линейного предшественника путем транскрипции *in vitro*. Получившийся линейный предшественник имеет три фосфатные группы на 5'-конце, поэтому не подходит для прямого лигирования. Одним из способов удаления фосфатных групп является дефосфорилирование пирофосфогидролазой (RppH), которая удаляет пирофосфат, оставляя одну фосфатную группу на 5'-конце. При добавлении в реакционную смесь второго фермента — T4 РНК-лигазы 1 — происходит образование фосфодиэфирной связи между 5'-фосфатом и 3'-гидроксильной группой РНК, что необходимо для замыкания молекулы в кольцо. Разработка рекомбинантных ферментов позволит удешевить и стандартизировать синтез кРНК, а также в дальнейшем масштабировать его для биомедицинских задач.

Получение рекомбинантных ферментов

Ген *rppH*, кодирующий пирофосфогидролазу, был амплифицирован из геномной ДНК *E. coli*, штамм K-12. Ген *rnlA*, кодирующий T4 РНК-лигазу 1, получен путем синтеза *de novo* с оптимизацией кодонного состава. Клонирование целевых генов проводили в вектор pET-21a(+) (Novagen, Англия) по сайтам рестрикции NdeI и XhoI (Сибэнзим, Россия).

Полученные плазмида pET-21a-RppH и pET-21a-RnlA, кодирующие RppH и T4 РНК-лигазу 1, трансформировали в клетки *E. coli* BL21(DE3). Индукцию проводили 1 mM ИПТГ с последующей инкубацией при 16 °C в течение 20 ч, или при 25 °C в течение 6 ч, или при 37 °C в течение 4 ч.

Очистку рекомбинантных ферментов проводили с использованием сорбента Ni-NTA агарозы (Биоспецифика, Россия). Элюцию проводили в буфере, содержащем 20 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, имидазол 500 mM, pH 7,5 для RppH и RnlA. В дальнейшем проводили обессоливание с помощью Sephadex G-10

(Pharmacia, Швеция) на оптимизированные буферы для хранения. Для длительного хранения при -20°C в буфер добавляли 50 % глицерола по объему.

Результаты и обсуждение

Продукцию рекомбинантных ферментов пирофосфогидролазы и T4 РНК-лигазы 1 подтвердили методом электрофореза лизатов клеток штаммов-продуцентов *E. coli* BL21(DE3)/pET-21(a)-RppH и *E. coli* BL21(DE3)/pET-21(a)-RnlA в полиакриламидном геле. Поскольку ферменты предпочтительней выделять из растворимой фракции во избежание потери активности при рефолдинге, были подобраны температурные условия, при которых ферменты не уходили в нерастворимую фракцию.

В ходе экспериментов было обнаружено, что при культивировании при температуре 16°C целевые белки переходят в растворимую фракцию, а при более высоких температурах — в тельца включения.

Рекомбинантные ферменты выделяли методом аффинной хроматографии. Элюцию проводили пошагово. Элюция целевых белков происходила преимущественно при концентрации имидазола от 120 до 200 мМ.

Для оценки чистоты и подтверждения молекулярной массы очищенных ферментов фракции после смены буфера анализировали методом электрофореза SDS-PAGE. Электрофоретический анализ очищенных ферментов показал соответствие молекулярного веса литературным данным: около 20 кДа для RppH и около 43 кДа для T4 РНК-лигазы 1. Чистота очищенных белков составляла более 90 %.

Ферменты были стабильны в течение 3 месяцев при хранении в буфере с глицеролом при -20°C . Активность ферментов проверялась в модельных реакциях дефосфорилирования и лигирования РНК с использованием синтетических олигонуклеотидов, и соответствовала коммерческим аналогам.

Заключение

Разработанный метод получения рекомбинантных ферментов пирофосфогидролазы RppH и T4 РНК-лигазы 1 обеспечивает высокую степень чистоты и активность целевых белков, достаточную для использования в протоколах синтеза кольцевых РНК *in vitro*. Оптимизация условий экспрессии и очистки позволила избежать стадии рефолдинга.