

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-247

КЛОНИРОВАНИЕ, НАРАБОТКА И ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ДЛЯ РЕКОМБИНАЗНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ^{*}

CLONING, PRODUCTION AND ISOLATION OF PROTEINS FOR RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION

Е. С. Галабурдина^{1,2}, И. П. Оскорбин^{1,2}, М. Л. Филипенко¹

¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

²*Новосибирский государственный университет*

E. S. Galaburdina^{1,2}, I. P. Oskorbin^{1,2}, M. L. Filipenko¹

¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*

²*Novosibirsk State University*

 e.galaburdina@g.nsu.ru

Аннотация

Определены оптимальные условия (температура, штамм *E. coli*) для препаративной наработки белков, задействованных в рекомбиназной полимеразной амплификации (РПА). Получена плазмида для наработки белка SSB фага T4. Белки UvsX, UvsY, креатинкиназа М свиньи, белок SSB *T. thermophilus* наработаны и очищены до 85%-й электрофоретической чистоты, подтверждено отсутствие примесных нуклеаз в их препаратах.

Abstract

Expression of recombinant proteins for recombinase polymerase amplification (RPA) was optimized in terms of the *E. coli* strain and expression temperature. The T4 phage SSB protein was cloned in an expression plasmid. UvsX, UvsY proteins, porcine creatine, kinase type M, *T. thermophilus* SSB protein were produced and purified up to 85 % electrophoretic purity without a confirmed residual nuclease activities.

Введение

Рекомбиназная полимеразная амплификация (РПА) — метод изотермической амплификации нуклеиновых кислот, основанный на использовании пары олигонуклеотидных праймеров, рекомбиназы, ДНК-полимеразы, белка SSB и креатинкиназы, генерирующей АТФ [1]. Преимущества РПА в создании тест-систем для диагностики инфекционных агентов заключаются в постоянной температуре амплификации, оптимум которой находится в диапазоне 37–42 °C, высокой чувствительности, сравнимой с ПЦР, и необходимости синтеза только двух праймеров в отличие от LAMP, другого популярного метода изотермической амплификации. Денатурация и отжиг праймеров для РПА не требуются, что значительно снижает требования к приборному обеспечению. РПА — удобный и быстрый метод диагностики заболеваний, однако на сегодняшний день производство компонентов для этого вида амплификации в России отсутствует, что затрудняет разработку РПА-тестов. Таким образом, целью настоящей работы было клонирование, наработка в *E. coli* и очистка рекомбинантных белков для рекомбиназной полимеразной амплификации: рекомбиназы UvsX, фактора загрузки рекомбиназы UvsY, SSB-белка фага T4 и креатинкиназы типа M *Sus scrofa* (KK-M).

Материалы и методы

Нуклеотидную последовательность гена 32-го бактериофага T4 (T4 SSB-белка) наработали с помощью ПЦР по матрице геномной ДНК фага T4, а последовательность KK-M свиньи наработали посредством ОТ-ПЦР по матрице РНК, выделенной из мышц *Sus scrofa*. Полученные ампликоны клонировали в вектор pAL2-T TA-клонированием, затем перенесли в экспрессионный вектор pET23a рестриктазно-лигазным клонированием, наличие необходимых вставок в векторах подтвердили ПЦР-скринингом. Отсутствие нуклеотидных замен в клонированных последовательностях установили секвенированием по Сэнгеру.

Для наработки в *E. coli* белков UvsX, UvsY и белка SSB *Thermus thermophilus* использовали полученные ранее в лаборатории экспрессионные плазмиды с кодирующими последовательностями этих белков. Оптимизировали условия наработки UvsX, UvsY и креатинкиназы типа M, варьируя температуру инкубации с 1 мМ ИПТГ

^{*} Исследование выполнено в рамках государственного задания Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (№ 125012300657-2).

(18, 25, 37 °C) и штамм *E. coli* — BL21 (DE3) pLysS и Rosetta Blue (DE3). Для наработки белка SSB *T. thermophilus* оптимизировали условия (температуру и штамм *E. coli*) автоиндукции по Стадиеру. В подобранных условиях наработали белки в 1 л среды LB. Рекомбинантные KK-M, UvsX, UvsY очистили при помощи аффинной и ионообменной хроматографии, а белок SSB *T. thermophilus* — аффинной хроматографией. Степень чистоты рекомбинантных белков и их количество оценили денатурирующим гель-электрофорезом по Лэммли. Нуклеазные активности в препаратах белков оценили с помощью инкубации с линейной ДНК фага T7 и плазмидой pQE30 с последующим гель-электрофорезом в агарозном геле.

Результаты

Получены плазмиды на основе вектора pET23a для наработки белка SSB бактериофага T4 и креатинкиназы типа M *Sus scrofa* без нуклеотидных замен, приводящих к аминокислотным заменам. Проведен подбор оптимальных условий (температура, штамм *E. coli*) для наработки рекомбинантных белков UvsX (37 °C, Rosetta Blue (DE3)), UvsY (37 °C, BL21 (DE3) pLysS), KK-M свиньи (25 °C, BL21 (DE3) pLysS) и белка SSB *T. thermophilus* (автоиндуция по Стадиеру, 25 °C, BL21 (DE3) pLysS). В клетках *E. coli* наработаны и очищены с электрофоретической чистотой не менее 85 % белки UvsX (3,6 мг белка из 3 г биомассы), UvsY (6,8 мг белка из 4,3 г биомассы), KK-M *Sus scrofa* (75 мг белка из 4,6 г биомассы), белок SSB *T. thermophilus* (2,6 мг белка из 2 мг биомассы).

Заключение

Полученные результаты по клонированию кодирующих последовательностей, оптимизации условий наработки в *E. coli* и очистке белков, необходимых для рекомбиназной полимеразной амплификации, позволят получить полный набор компонентов для создания тест-систем на основе РПА.

Литература

1. Piepenburg O., Williams C. H., Stemple D. L., Armes N.A. DNA detection using recombination proteins // PLoS Biology. 2006. Vol. 4, No. 7. P. 1115–1121.