

УДК 579.222:577.217

Ю.Ю. Кондратюк<sup>1, 2</sup>, М.А. Бабарик<sup>2</sup>, О.І. Корнелюк<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка,  
вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна, e-mail: kondratyuk\_yulya@ukr.net

<sup>2</sup>Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, вул. Академіка  
Заболотного, 150, 03143, м. Київ-143, Україна

## ОПТИМІЗАЦІЯ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗИ ССАВЦІВ ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ ШТАМУ *ESCHERICHIA COLI* BL21(DE3)*pLysE*

*Проведено оптимізацію умов бактеріальної експресії рекомбінантної тирозил-тРНК синтетази. Досліджено вплив концентрації індуктора синтезу цільового білка на його кінцевий вихід і встановлено оптимальний час культивування бактеріальної культури до та після додавання індуктора. Запропоновано оптимальну схему культивування штаму *E. coli* BL21(DE3)*pLysE* для досягнення високого рівня виходу рекомбінантного білка.*

*К л ю ч о в і с л о в а: тирозил-тРНК синтетаза, бактеріальна система експресії, оптимізація експресії.*

Аміноацил-тРНК синтетази (АРСази) [КФ 6.1.1.] — ключові ферменти білоксинтезувального апарату клітини, які беруть участь в реалізації генетичної інформації та каталізують високоспецифічне аміноацилювання гомологічних транспортних РНК [1, 7]. Крім того, еукаріотні АРСази виконують також ряд неканонічних функцій, у тому числі після протеолітичного розщеплення проявляють цитокинові активності [4]. Найявність цитокинових активностей у АРСаз відкриває перспективи для їх наступного застосування як нових біотерапевтичних препаратів.

Тирозил-тРНК синтетаза ссавців є однією з найбільш вивчених АРСаз ссавців [1, 4]. Цей фермент складається з двох структурних модулів: NH<sub>2</sub>-кінцевого каталітичного модуля та цитокінподібного COOH-кінцевого модуля — гомолога цитокіна ЕМАР II (ендотеліального та моноцитаривувального поліпептида II). Некаталітичний С-модуль цитоплазматичної TugRS ссавців має подвійну функцію: бере участь у зв'язуванні тРНК як *цис*-фактор та після протеолітичного відщеплення від каталітичного кора синтетази проявляє цитокинову активність, подібну до ЕМАР II [5, 9]. В повнорозмірній TugRS ссавців модулі з'єднані гнучким неструктурованим міжмодульним лінкером, який містить сигнал для протеолітичного розщеплення — амінокислотну послідовність PEST [1, 4]. До цього часу просторова



структура повнорозмірної TugRS людини ще не встановлена: кристалографічні структури визначені тільки для окремих каталітичного [11] та ЕМАР II-подібного С-кінцевого модулів [10]. Для проведення структурних досліджень білків методами рентгенівської кристалографії або мультимірної ЯМР-спектроскопії необхідні препаративні кількості білків — десятки мг. Тому для забезпечення цих досліджень необхідним є використання вискоєфективних оптимізованих систем експресії рекомбінантних білків.

З цією метою в даній роботі здійснено підбір оптимальних умов культивування бактеріальної культури та експресії цільового білка — TugRS ссавців в препаративних кількостях для подальших структурних досліджень.

### Матеріали і методи

В роботі використано штам-продуцент рекомбінантних білків, отриманий на основі реципієнта *Escherichia coli* BL21(DE3)*pLysE*. Штам трансформований за загальноприйнятою методикою [2] відповідним сконструйованим плазмідним вектором pET30a-59K TugRS, у якого під контролем промотора фага T7 містяться гени, що кодуєть синтез цільового білка — повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази (59K TugRS). Генетичним маркером плазміди pET30a є ген *kan*, що забезпечує стійкість трансформованих клітин до канаміцину.

Штам-продуцент вирощували на середовищі Luria-Bertani (LB), що містить 5 г дріжджового екстракту, 10 г трипону, 10 г NaCl в 1 л з додаванням антибіотика канаміцину до кінцевої його концентрації в розчині 30 мкг/мл. Культуру інкубували при температурі 37 °C та інтенсивній аерації (130 об/хв) до досягнення нею оптичної густини 0,3–1,3 (залежно від часу культивування культури). Оптичну густину ( $OD_{600}$ ) визначали спектрофотометрично (спектрофотометр BioMate-5, Велика Британія) при довжині хвилі 600 нм.

Для індукції синтезу рекомбінантного білка в культуральне середовище додавали ізопропіл- $\beta$ -тіогалактопіранозид (ІПТГ) до кінцевих концентрацій 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 мМ. Визначали час культивування культури до індукції (1, 2, 3 год) та після (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 год) індукції експресії.

Для експресії TugRS підбирали оптимальне середовище культивування бактеріальної культури: середовище Luria-Bertani, м'ясо-пептонний агар (пептон, суміш амінокислот,  $Na_2CO_3$ , NaCl), мінімальне середовище А (глюкоза, тіамін, біотин,  $MgSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $NH_4Cl$ , NaCl,  $Na_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ , солі заліза, цинку, міді, кобальту, бору, марганцю як мікроелементи).

Рекомбінантний білок отримували із супернатанту лізованих клітин *E. coli* методом металхелатувальної хроматографії на Ni-NTA-агарозній колонці. Клітини руйнували ультразвуком, освітлювали лізат центрифугуванням. Супернатант наносили на колонку з Ni-NTA-агарозою (Qiagen, США). Цільовий білок елюювали буфером для елюції (50 мМ натрій-фосфатний буфер, 150 мМ NaCl, 200 мМ імідазолу, 5 мМ  $\beta$ -меркаптоетанолу). Фракції, що містили цільовий білок діалізували.

Аналіз бактеріальних білків проводили за допомогою SDS-гель-електрофорезу по Леммлі в денатурувальних умовах (12% розділювальний гель) [6], використовуючи суміш маркерних білків фірми Fermentas (Литва). Гелі фарбували Coomassie blue R-250. Вміст білків визначали денситометрично (денситометр LKB UltroScan XL, Швеція). При статистичній обробці результатів дослідження використовували пакет статистичних програм STATISTICA 7.0. Одержані результати представлені у вигляді середніх значень з урахуванням середніх квадратичних відхилень.

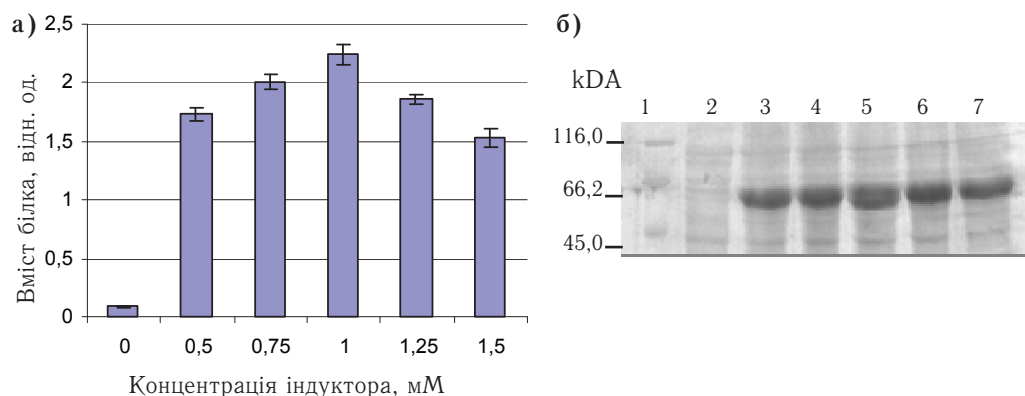


## Результати та їх обговорення

Система експресії на основі РНК-полімерази фага Т7 — одна з найефективніших прокаріотних систем, що широко використовуються для отримання цільових продуктів як про-, так і еукаріотного походження. Вона з успіхом використовується для біосинтезу рекомбінантних білків в лабораторних умовах і в умовах великомасштабного виробництва. Найчастіше в ролі продуцента в таких системах виступає штам *E. coli* BL21(DE3)*pLysE*, спеціально для цього сконструйований [2]. В клітинах *E. coli* BL21(DE3) ген РНК-полімерази фага Т7 під контролем *lac UV5* промотора локалізується в бактеріальній хромосомі, куди він інтегрований у складі фага  $\lambda$ . Штам *E. coli* BL21(DE3) використовують як реципієнт для різних плазмідних векторів, в яких цільовий ген вбудований під контроль одного з промоторів, що впізнаються РНК-полімеразою фага Т7. Індукція синтезу фагового фрагмента і, як наслідок, високоефективна транскрипція цільового гену в складі рекомбінантної плазмиди спостерігаються після додавання в середовище культивування індуктора — ІПТГ [3, 8].

Важливим моментом на етапі внесення в культуральне середовище індуктора синтезу цільового білка є час його додавання, адже від стадії росту, на якій знаходиться бактеріальна культура, залежить синтез потрібного продукту. Оптимальним є час, коли культура знаходиться в логарифмічній фазі росту.

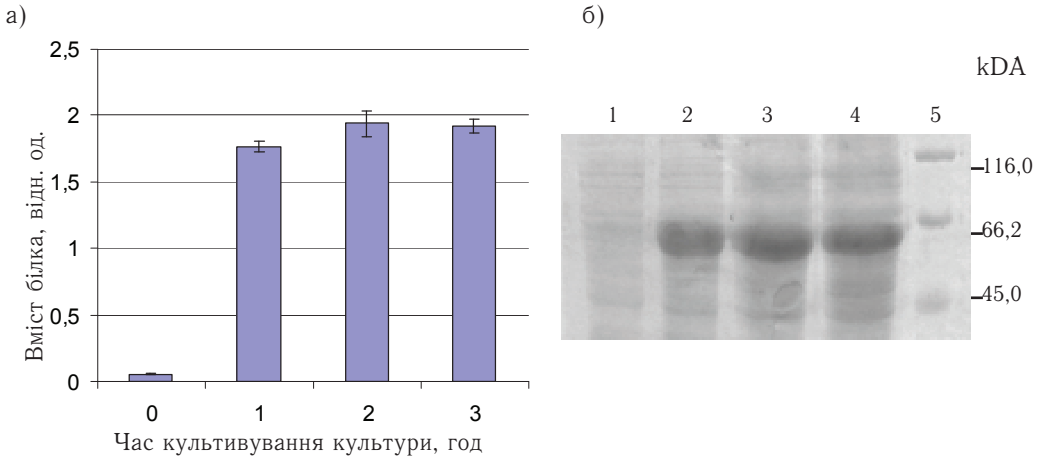
Нами досліджено рівень експресії білка 59К TyrRS залежно від кількості ІПТГ та часу культивування бактеріальної культури до індукції. Як видно з рисунка 1, при підвищенні концентрації індуктора до 1 мМ спостерігалось чітке зростання рівня експресії білка. При подальшому збільшенні кількості ІПТГ така тенденція втрачалася і навпаки відмічався спад рівня експресії.



**Рис. 1. Рівень експресії білка 59К TyrRS залежно від концентрації ІПТГ:**  
 а) залежність виходу білка від концентрації індуктора; б) електрофореграма білків, отриманих при додаванні різної кількості ІПТГ. 1 — білкові маркери молекулярної маси ("Fermentas", Литва); 2 — лізат до індукції; 3–7 — лізати після індукції (0,5 мМ, 0,75 мМ, 1 мМ, 1,25 мМ, 1,5 мМ ІПТГ, відповідно).

**Fig. 1. The expression level of 59K TyrRS protein depending on the IPTG concentration:** a) the dependence of protein output upon concentration of inductor; b) electropherograms of proteins, obtained by adding different amount of IPTG. 1 — protein molecular weight markers ("Fermentas", Lithuania), 2 — without inducer; 3–7 — induced with 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM, 1,25 mM, 1,5 mM IPTG respectively.

Максимальна кількість білка спостерігалася за умови додавання в середовище культивування індуктора на другу годину росту культури ( $OG_{600}=0,7-0,9$ ), що пояснюється імовірним досягненням культурою найбільш сприятливої фази росту (рис. 2):



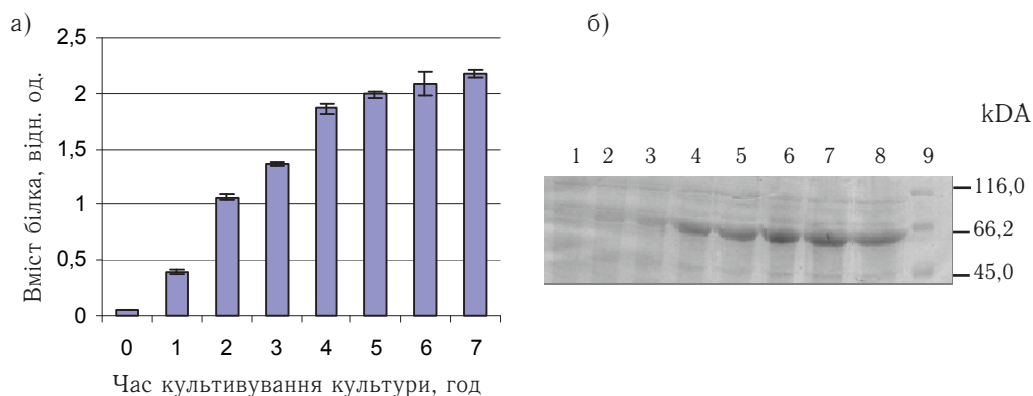
**Рис. 2.** Рівень експресії білка 59К TyrRS залежно від часу культивування бактеріальної культури до індукції: а) залежність виходу білка від часу культивування; б) електрофореграма білків, отриманих за різного часу культивування.

1 – лізат до індукції; 2–4 – лізати після індукції (1, 2, 3 год культивування до індукції, відповідно); 5 – білкові маркери молекулярної маси (“Fermentas”, Литва).

**Fig. 2.** The level of expression of 59K TyrRS protein depending on the time of bacterial culture cultivation to induction: a) the dependence of protein output of cultivation time; b) electrophoregrams of proteins, obtained at different time of cultivation. 1 – without inducer; 2–4 – after induction (1, 2, 3 h of cultivation with inducer, respectively); 5 – protein molecular weight markers (“Fermentas”, Lithuania).

При дослідженні рівня експресії білка залежно від часу культивування культури після індукції показано найбільший приріст експресії цільового білка при культивуванні культури протягом 4 год. При подальшому культивуванні спостерігали незначне зростання біосинтезу білка 59К TyrRS та збільшення синтезу бактеріальних білків (рис. 3).

Накопичення в біомасі клітин цільового продукту при культивуванні рекомбінантних штамів-продуцентів залежить не лише від генотипових властивостей популяції рекомбінантних клітин, а також великою мірою обумовлене якістю та кількістю субстратів. Вдало підібране ростове середовище дозволяє досягати високих рівнів виходу цільових білків.



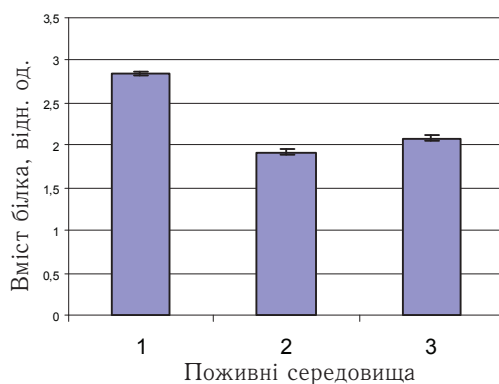
**Рис. 3.** Рівень експресії білка 59K TyrRS залежно від часу культивування культури після індукції: а) залежність виходу білка від часу культивування; б) електрофореграма білків, отриманих за різного часу культивування. 1 – лізат до індукції; 2–8 – лізати після індукції (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 год культивування після індукції, відповідно); 9 – білкові маркери молекулярної маси (“Fermentas”, Литва).

**Fig. 3.** The level of expression of 59K TyrRS protein depending on the time of cultivation of bacterial culture after induction:

a) the dependence of protein output of cultivation time; b) electrophoregrams of proteins, obtained at different cultivation time.

1 – without inducer; 2–8 – after induction (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 h of cultivation with inductor, respectively); 9 – protein molecular weight markers (“Fermentas”, Lithuania).

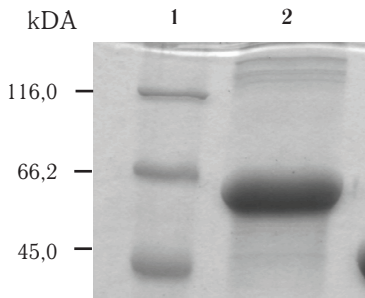
При культивуванні бактеріальної культури на різних поживних середовищах встановили, що найвищий рівень експресії білка 59K TyrRS спостерігався при вирощуванні на мінімальному середовищі А, що пояснюється наявністю в ньому тіаміну, біотину та мікроелементів (рис. 4).



**Рис. 4.** Рівень експресії білка 59K TyrRS залежно від середовища культивування бактеріальної культури: 1 – мінімальне середовище А; 2 – LB; 3 – МПА.

**Fig. 4.** The level of expression of 59K TyrRS protein depending on cultivation medium: 1 – minimal medium A, 2 – LB, 3 – beef-extract agar.

Проведено бактеріальну експресію та афінну очистку білка 60kTyrRS. Отримано необхідну для подальших досліджень кількість даного білка високого ступеня чистоти (рис. 5).



**Рис. 5. Електрофоретичний контроль чистоти білків (12% розділювальний гель):**

1 – білкові маркери молекулярної маси (“Fermentas”, Литва), 2 – білок 59K TyrRS.

**Fig. 5. Electrophoregrams of protein purity control (SDS-12% PAGE):**

1 – protein molecular weight markers (“Fermentas”, Lithuania), 2 – protein 59K TyrRS.

Отже, в результаті досліджень здійснено оптимізацію бактеріальної експресії повнорозмірної тирозил-трНК синтетази ссавців. Встановлено, що оптимальна кількість індуктора ІПТГ для експресії TyrRS ссавців становить 1 мМ, а час культивування бактеріальної культури до та після індукції синтезу цільового білка становить дві та чотири години, відповідно. Вихід цільового білка – TyrRS ссавців – при бактеріальній експресії в культурі клітин *E. coli* BL21(DE3)*pLysE* складає 68,52 мг з 1 л культуральної рідини, що відповідає 29% сумарних бактеріальних білків. Отриманий вихід білка є достатнім для проведення наступних структурних досліджень TyrRS ссавців фізичними методами: рентгеноструктурним аналізом та ЯМР-спектроскопією.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Корнелюк А.И. Структурно-функциональное исследование тирозил-трНК синтетазы млекопитающих // Биополимеры и клетка. – 1998. – Т. 14, № 4. – С. 349–359.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 479 с.
3. Славченко И.В., Борейко Е.В. Фенотипическое проявление особенностей метаболизма клеток *Escherichia coli* BL 21(DE3) при выращивании на средах, содержащих разные источники углерода // Биополимеры и клетка. – 2002. – Т. 18. – № 3. – С. 232–236.
4. Ivakhno S. S., Kornelyuk A. I. Cytokine-like activities of some aminoacyl-tRNA synthetases and auxiliary p43 cofactor of aminoacylation reaction and their role in oncogenesis // Exper. Oncol. – 2004. – V. 26. – P. 250–255.
5. Kornelyuk A.I., Tas M.P., Dubrovsky A.L., Murray J.C. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase // Biopolimery i kletka. – 1999. – V. 15, № 2. – P. 168–172.
6. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – V. 227, № 259. – P. 680–685.
7. Schimmel P. Aminoacyl-tRNA synthetase: general features and recognition of transfer RNAs // Ann. Rev. Biochem. – 1987. – V. 56. – P. 125–158.
8. Studier F.W., Moffatt B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes // J. Mol. Biol. – 1986. – V. 189D, № 1. – P. 113–130.
9. Wakasugi K., Schimmel P. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase // Science. – 1999. – V. 284. – P. 147–151.
10. Yang X.L., Liu J., Skene R.J., McRee D. and Schimmel P. Crystal Structure of an EMAP-II-Like Cytokine Released from a Human tRNA Synthetase // Helvetica Chimica Acta – 2003. – V. 86. – P. 1246–1257.
11. Yang X.L., Skene R.J., McRee D.E., Schimmel P. Crystal structure of a human aminoacyl-tRNA synthetase cytokine // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2002. – V. 99, № 243. – P. 15369–15374.

Ю.Ю. Кондратюк<sup>1,2</sup>, М.А. Бабарык<sup>2</sup>, А.И. Корнелюк<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка,  
ул. Владимирская, 64, Киев, 01033, Украина, e-mail: kondratyuk\_yulya@ukr.net

<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, ул. Академика  
Заболотного, 150, 03143, г. Киев-143, Украина

## ОПТИМИЗАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* BL21 (DE3) *pLysE*

### Реферат

Проведена оптимизация условий бактериальной экспрессии рекомбинантной тирозил-тРНК синтетазы. Исследовано влияние концентрации индуктора синтеза целевого белка на его конечный выход, а также установлено оптимальное время культивирования бактериальной культуры до и после добавления индуктора. Предложена оптимальная схема культивирования культуры *E. coli* BL21 (DE3) *pLysE* для достижения высокого уровня выхода рекомбинантного белка.

К л ю ч е в ы е с л о в а: тирозил-тРНК синтетаза, бактериальная система экспрессии, оптимизация экспрессии.

Yu.Yu. Kondratiuk<sup>1,2</sup>, M.A. Babaryk<sup>2</sup>, O.I. Kornelyuk<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Taras Shevchenko University of Kyiv, Volodymyrska str., 64, Kyiv, 01033,  
Ukraine, e-mail: kondratyuk\_yulya@ukr.net

<sup>2</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU, Zabolotny str., 150,  
Kyiv-143, 03143, Ukraine

## BACTERIAL EXPRESSION OPTIMIZATION OF MAMMALIAN TYROSYL-tRNA SYNTHETASE ON STRAIN *ESCHERICHIA COLI* BL21 (DE3) *pLysE* CULTIVATION

### Summary

The optimization of the conditions of bacterial expression of recombinant tyrosyl-tRNA synthetase was conducted. The influence of the concentration of synthesis inductor of target protein at its final output and the best time of cultivation of bacterial culture before and after inductor adding was investigated. The optimal conditions for culture *E. coli* BL21 (DE3) *pLysE* cultivation to achieve a high expression level of recombinant protein were proposed.

К e y w o r d s: tyrosyl-tRNA synthetase, bacterial expression system, optimization of expression.

