

УДК 579.222:577.217

Н.В. Воробйова^{1,2}, О.І. Корнелюк^{1,2}

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, Київ, Україна, 01033;

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03143,
тел.: +38 (044) 526 55 89, +38 (044) 526 07 56
e-mail: vorobyova_natali_0307@ukr.net

ОПТИМІЗАЦІЯ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЕКСПРЕСІЇ РЕКОМБІНАНТНОГО БІЛКА АІМР1/Р43 – КОМПОНЕНТА МУЛЬТИСИНТЕТАЗНОГО КОМПЛЕКСУ ЛЮДИНИ ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ ШТАМУ *ESCHERICHIA COLI* BL21(DE3)RIL

Мета. Оптимізація умов бактеріальної експресії рекомбінантного білка АІМР1/р43 людини для підвищення виходу і концентрації стабільного нативного білка у розчині. **Методи.** Культивування в бактеріальній системі експресії; метал-хелатувальна афінна хроматографія, гель-електрофорез. **Результати.** Досліджено вплив концентрації індуктора синтезу цільового білка ізопропіл-β-тіогалактопіранозид (ІПТГ) на кінцевий вихід білка та визначено оптимальні температура і час культивування бактерій після додавання індуктора. Запропоновано оптимальну схему культивування штаму *Escherichia coli* BL21(DE3) RIL для досягнення високого рівня виходу рекомбінантного білка у розчинній формі. **Висновки.** За отриманими результатами встановлено, що кількість рекомбінантного білка АІМР1/р43 у розчинній формі суттєво підвищується при зменшенні концентрації ІПТГ до 0,5 мМ, зниженні температури культивування культури до 25 °С та збільшення часу культивування до 8 годин. Це відкриває перспективу отримання цього білка у препаративних кількостях для подальших структурних досліджень та впровадження як нового продукту молекулярної біотехнології.

Ключові слова: білок АІМР1/р43, бактеріальна система експресії, оптимізація експресії.

Сучасна молекулярна біотехнологія орієнтована на створення нових біомедичних препаратів на основі рекомбінантних білків [1]. Рекомбінантна експресія білків в *E. coli* є простим, швидким, недорогим і надійним методом, який дозволяє отримати цільові білки з високим виходом, що є необхідною умовою для впровадження даного метода у біотехнологічне виробництво. Однак для ефективної продукції рекомбінантних білків в бактеріальних системах необ-

© Н.В. Воробйова, О.І. Корнелюк, 2015



хідно проведення оптимізації умов експресії для досягнення максимального виходу білка у розчинному стані [2].

Білок АІМР1/р43 людини (ргоЕМАР-II) є обов'язковим компонентом мультиаміноацил-тРНКсинтетазного комплексу вищих еукаріотів [3], поліпептидний склад якого консервативний для організмів різного рівня організації від комах до ссавців. Враховуючи, що білок АІМР1/р43 містить послідовність цитокіна ЕМАР-II і ряд не досліджених до кінця властивостей, зокрема локалізацію білка АІМР1/р43 в клітинному ядрі [4, 5] та наявність у нього цитокінової активності [6, 7], можна віднести даний білок до молекулярних об'єктів, які становлять інтерес як перспективного продукту молекулярної біотехнології.

До цього часу просторова структура повнорозмірного білка АІМР1/р43 не встановлена: кристалографічну структуру визначено тільки для його С-кінцевого модуля – цитокіна ЕМАР-II [8, 9]. Для проведення структурних досліджень білка р43 методами рентгеноструктурної кристалографії і мультимірної ЯМР-спектроскопії необхідні препаративні кількості білка. Отже, для забезпечення структурних досліджень білка АІМР1/р43 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 АІМР1/р43 людини в препаративних кількостях для подальших структурних досліджень.

Матеріали і методи

В роботі використано штам-продуцент рекомбінантних білків, отриманий на основі реципієнта *E. coli* BL21 *CodonPlus*(DE3)-RIL (Stratagene, США). Штам трансформований за загально прийнятою методикою відповідною конструкцією, що була створена на базі вектору рЕТ-30а(+) *E. coli* ("Novagen", США, 5422 п.н.) і містила ген, що кодує синтез цільового білка АІМР1/р43 під контролем промотора фага Т7. Селективним маркером плазмиди рЕТ30а(+) є ген *kan*, який забезпечує стійкість трансформованих клітин до антибіотику канаміцину.

Клонування отриманої з сумарної кДНК тканин людини вставки довжиною 1066 п.н. проводили з використанням олігонуклеотидних праймерів Direct (р43f), 35 нт, з сайтом *NdeI*, *catatg*: 5'-CAGTCATG*catatg*GCAA-ATAATGATGCTGTTCTG-3' та Reverse (р43r), 55 нт з сайтом *NcoI*, *ccatgg*, що містив кодони для 6хHis-Tag в С-кінцевій частині білка: 5'-ATCATGCC ATGGTCAATGATGATGATGGTGTTTGATTCCACTGTTGC-TCATG-3'. Для клонування було використано сайти рестрикції *NdeI* та *NcoI*, що входили до складу праймерів. Отримана конструкція позначена як рЕТ-30а-р43С2 (6488 п. н.).

Фізико-хімічні властивості білка АІМР1/р43 проаналізовані за допомогою сервера ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>): молекулярна вага 35175.5 Да; ізоелектрична точка pI = 8.62; коефіцієнт екстинції АІМР1/р43 при довжині хвилі 280 нм складає 9970 М⁻¹ см⁻¹ (0,29 мл/мг).

Штам-продуцент вирощували на середовищі Luria-Bertani (LB) з додаванням антибіотика канаміцину до кінцевої концентрації 30 мкг/мл. Культуру



інкубували при температурі 37 °С та інтенсивному струшуванні при 250 об/хв до досягнення нею оптичної густини 0,5–0,7 о.о. Оптичну густину ($ОГ_{600}$) визначали спектрофотометрично (спектрофотометр *BioMate-5*, Велика Британія) при довжині хвилі 600 нм.

Для індукції синтезу рекомбінантного білка до культурального середовища додавали індуктор ППГ – ізопропіл- β -тіоґалактопіранозид (*Sigma*, США) до кінцевих концентрацій 0,1; 0,25; 0,5 і 1,0 мМ. Визначали оптимальний час (2, 4, 8, 12 і 16 годин) та температуру (15, 20, 25, 30 і 37 °С) культивування бактерій після індукції експресії.

Рекомбінантний білок отримували із супернатанту лізованих клітин *E. coli* методом метал-хелатувальної хроматографії на колонці з Ni-NTA-агарозою (*Qiagen*, Germany). Аналіз бактеріальних білків проводили за допомогою SDS-гель-електрофорезу за методом Леммлі в денатуруючих умовах у 12% розділювальному гелі [7], використовуючи суміш маркерних білків виробництва *Thermo Scientific* (Литва). Гелі забарвлювали Coomassie blue R-250.

Відносні кількості розчинної і функціонально-активної форми білка в супернатантах та загальні кількості білка після експресії оцінювали скануванням акриламідних гелів, подальші обчислення проводили за допомогою програмного пакету *TotalLab*. Статистичну обробку даних проводили за допомогою програмного пакету «Excel 2007», наведені результати представлені у вигляді середніх значень з урахуванням середніх квадратичних відхилень.

Концентрацію очищеного рекомбінантного білка АІМР1/р43 визначали спектрофотометрично, використовуючи коефіцієнти екстинкції $9970 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (0,29 мл/мг) при довжині хвилі 280 нм.

Результати та їх обговорення

Однією з проблем при експресії АІМР1/р43 за стандартних умов ($T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, концентрація ППГ – 1 мМ та $t = 4$ год) є його агрегація і утворення тілець включення, що може свідчити про неправильну укладку поліпептидного ланцюга за рахунок високого рівня експресії. Отже, необхідно здійснити підбір умов бактеріальної експресії, за яких максимальним буде вихід розчинної функціонально-активної форми АІМР1/р43 по відношенню до загального рівня експресії.

При проведенні оптимізації умов культивування штаму-продуцента рекомбінантного білка АІМР1/р43 враховувалися такі фактори, як концентрація індуктора експресії ППГ, час та температура культивування штаму-продуцента після додавання індуктора.

При підвищенні концентрації індуктора до 1 мМ спостерігається зростання рівня експресії білка (рис. 1а). Однак встановлено, що кількість білка у розчинному стані є максимальною при концентрації ППГ 0,5 мМ (рис. 1б).

При дослідженні рівня експресії білка залежно від часу культивування культури після індукції показано найбільший приріст експресії цільового білка при культивуванні культури протягом 12 годин (рис. 2а).



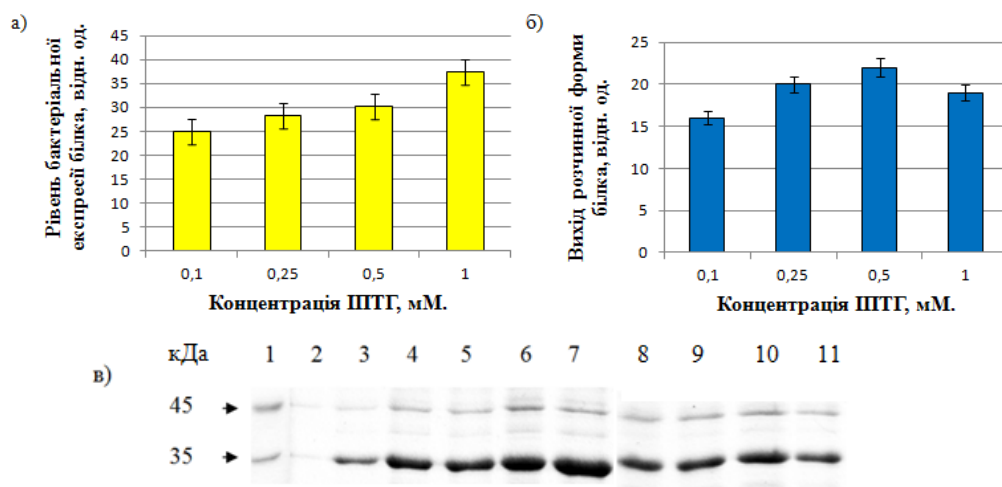


Рис. 1. Залежності рівня експресії білка АІМР1/р43 (а) і виходу його розчинної функціонально-активної форми (б) від концентрації ППТГ; електрофореграма загального вмісту білка в клітинах (4–7) та вмісту його розчинної форми (8–11) при різних концентраціях ППТГ (в)

1 – білкові маркери молекулярної маси (*ThermoScientific*, Литва); 2 – лізат до індукції; 3 – лізат після індукції, 4–7 – лізати і 8–11 – супернатанти після індукції при 0,1, 0,25, 0,5 і 1,0 мМ ППТГ, відповідно.

Fig. 1. Dependence of the expression level of AIMP1/p43 protein (a) and the yield of its soluble, functionally active form (b) on the concentration of IPTG in solution; electrophoretograms of total cell protein (4–7) and its soluble fraction (8–11) at different IPTG concentrations (c)

1 – protein molecular weight markers (*Thermo Scientific*, Lithuania), 2 – without IPTG inducer; 4–7 – lysates and 8–11 – supernatants, induced with 0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 mM IPTG, respectively.

Кількість розчинної форми білка є максимальною при культивуванні культури протягом 8 годин, при подальшому культивуванні спостерігається різке зниження кількості білка у розчинній формі (рис. 2б).

Важливим параметром, який впливає на бактеріальну експресію після її індукції є температура. Встановлено, що рівень бактеріальної експресії з підвищенням температури поступово збільшується і досягає максимуму при 25 °С, проте при подальшому підвищенні температури спостерігається зниження рівня експресії (рис. 3а). Кількість рекомбінантного білка АІМР1/р43 у розчинному стані є максимальною при культивуванні культури за температури 25 °С (рис. 3б).

Після проведення бактеріальної експресії здійснювали афінну очистку рекомбінантного білка ЕМАР ІІ металхелатувальною хроматографією на Ni-NTA агарозі. В результаті очистки білка АІМР1/р43 на Ni-NTA агарозі отримано препарат високого ступеня чистоти (близько 95%) (рис. 4).

Білок АІМР1/р43 людини, попередник цитокіна ЕМАР ІІ, є компонентом мультиаміноацил-тРНК синтетазного комплексу вищих еукаріотів і в ізолю-

ваному стані теж виявляє цитокинові активності. Проте, на відміну від ЕМАР II цей поліпептид є досить нестабільним, оскільки належить до природно неструктурованих білків [11,12]. Нами показано, що центральний фрагмент АІМР1/p43 Thr84-Asp146 є неструктурованим згідно даних біоінформатичного аналізу амінокислотної послідовності білка. Закономірно, що наявність неструктурованого фрагмента в АІМР1/p43 приводить до його значної агрегації при бактеріальній експресії та входження у тільця включення.

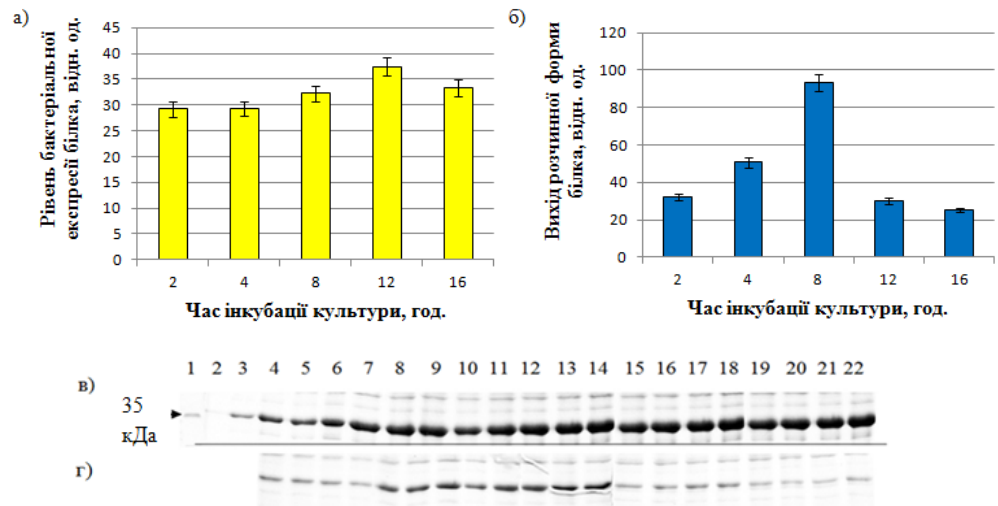


Рис. 2. Залежність рівня бактеріальної експресії білка АІМР1/p43 (а) і виходу його розчинної функціонально-активної форми (б) від часу культивування бактерій; електрофореграми загального вмісту білка в клітинах (в) та вмісту його розчинної форми (г) за різного часу культивування

1 – білкові маркери молекулярної маси; 2 – лізат до індукції; 3–6; 7–10; 11–14; 15–18 і 19–22 (г) – лізати після індукції протягом 2, 4, 8, 12, 16 годин при 0,1, 0,25, 0,5, 1,0 мМ ПТТГ відповідно; 3–6; 7–10; 11–14; 15–18 і 19–22 – супернатанти після індукції протягом 2, 4, 8, 12, 16 годин при 0,1, 0,25, 0,5 і 1,0 мМ ПТТГ, відповідно.

Fig. 2. Dependence of the expression level of AIMP1/p43 protein (a) and the yield of its soluble, functionally active form (b) on the cultivation time; electrophoretograms of total cell protein (c) and its soluble fraction (d), obtained at different time of cultivation

1 – protein molecular weight markers; 2 – without IPTG inducer; 3–6, 7–10, 11–14, 15–18 and 19–22 (c) – lysates after induction at 2, 4, 8, 12, 16 hours, respectively (0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 mM IPTG); 3–6, 7–10, 11–14, 15–18 and 19–22 – supernatants after induction with 2, 4, 8, 12, 16 hours, respectively (0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 mM IPTG).

З метою отримання максимального виходу білка АІМР1/p43 у розчинно-му стані нами проведена оптимізація його бактеріальної експресії у клітинах *E. coli* BL21(DE3)RIL. Встановлено, що оптимальна кількість індуктора ПТТГ для експресії АІМР1/p43 становить 0,5 мМ, оптимальні час і температура після індукції синтезу цільового білка становлять 8 годин і 25 °С, відповідно. Ви-



хід цільового білка АІМР1/р43 людини при бактеріальній експресії у культурі клітин *E. coli* BL21(DE3)RIL складає близько 5 мг з 1 л бактеріальної культури, що відповідає приблизно 8% сумарних бактеріальних білків. Отриманий вихід білка є достатнім для проведення подальших структурних досліджень методами оптичної та ЯМР-спектроскопії. Слід зазначити, що оптимальні умови бактеріальної експресії АІМР1/р43 суттєво відрізняються від визначених нами раніше оптимальних умов для експресії цитокіна ЕМАР ІІ [13], який є С-кінцевим доменом АІМР1/р43.

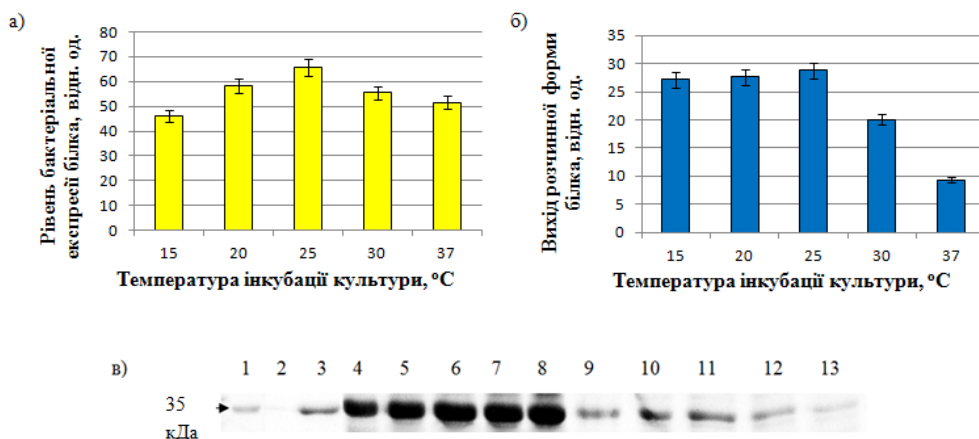


Рис. 3. Залежності рівня бактеріальної експресії білка АІМР1/р43 (а) та виходу його розчинної функціонально-активної форми (б) від температури культивування; електрофореграма загального вмісту білка в клітинах (4–8) та вмісту його розчинної форми (9–13) за різної температури культивування (в)

1 – білкові маркери молекулярної маси; 2 – лізат до індукції; 3 – лізат після індукції; 4–8 – лізати і 9–13 – супернатанти після індукції при 15, 20, 25, 30 і 37 °C відповідно

Fig. 3. Dependence of the expression level of AIMP1/p43 protein (a) and the yield of its soluble, functionally active form (b) on the cultivation temperature; electrophoretograms of total cell protein (4–8) and its soluble fraction (9–13), obtained at different cultivation temperatures (d)

1 – protein molecular weight markers; 2 – without inducer; 3–7 – lysates and 8–12 – supernatants after induction at 15, 20, 25, 30 and 37 °C, respectively

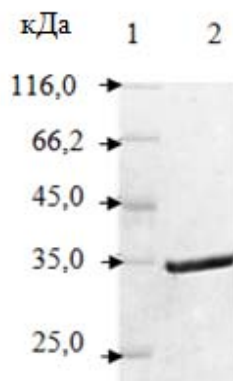


Рис. 4. Електрофоретичний контроль чистоти отриманого препарату АІМР1/р43

1 – білкові маркери молекулярної маси; 2 – препарат АІМР1/р43 після очистки.

Fig. 4. Electrophoretic analysis of AIMP1/p43 protein purity

1 – protein molecular weight markers; 2 – protein AIMP1/p43 after purification.

Отже, в результаті проведення даної роботи створено продуцент мультифункціонального білка АІМР1/р43 в бактеріальній системі експресії.

Білок АІМР1/р43 є перспективним препаратом для його подальшого впровадження як нового продукту сучасних генно-інженерних біотехнологій.

Біотехнологічне виробництво цього цитокіну є необхідним для проведення експериментальних досліджень впливу АІМР1/р43 на клітинні процеси (індукція апоптозу, вплив на ангиогенез), а в перспективі як нового лікарського препарату для інгібування пухлинного росту.

N.V. Vorobyova^{1,2}, O.I. Kornelyuk^{1,2}

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv,
64, Volodymyrska Str., Kyiv, Ukraine, 01033;

²Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine,
150, Academ. Zabolotny Str., Kyiv, Ukraine, 03680,
tel.: +38 (044) 526 55 89, +38 (044) 526 07 56
e-mail: vorobyova_natali_0307@ukr.net

BACTERIAL EXPRESSION OPTIMIZATION OF HUMAN AIMP1/P43 RECOMBINANT PROTEIN – A COMPONENT OF HUMAN MULTISYNTHETASE COMPLEX IN STRAIN OF ESCHERICHIA COLI BL21(DE3)RIL

Summary

Aim. The optimization of conditions for bacterial expression of recombinant protein AIMP1/p43 has been carried out in order to increase the yield of stable protein in solution. **Methods.** Protein expression in bacterial expression system, metal-chelating affinity chromatography, gel-electrophoresis. **Results.** The influence of expression inductor IPTG concentration on final yield of target protein has been studied. The optimal time and temperature of cultivation of bacterial culture with inductor has been investigated. Optimal culturing conditions for Escherichia coli BL21(DE3)RIL cultivation have been proposed to achieve a high expression level of soluble recombinant protein. **Conclusions.** It has been established that the yield of soluble recombinant AIMP1/p43 protein increased significantly with the decrease of IPTG concentration to 0,5 mM, decrease of temperature to 25°C and increase of cultivation time to 8 h. This gives one the possibility of preparing the protein AIMP1/p43 in enough amount for its further structural studies and use as a new molecular biotechnological product.

Key words: protein AIMP1/p43, bacterial expression system, optimization of expression.



Н.В. Воробьева^{1,2}, А.И. Корнелюк^{1,2}

¹Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,
ул. Владимирская, 64, Киев, Украина, 01033;

²Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина, 03143,
тел.: +38 (044) 526 55 89, +38 (044) 526 07 56
e-mail: vorobyova_natali_0307@ukr.net

ОПТИМИЗАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА АІМР1/Р43 – КОМПОНЕНТА МУЛЬТИСИНТЕТАЗНОГО КОМПЛЕКСА ЧЕЛОВЕКА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* BL21(DE3)RIL

Реферат

Цель. Оптимизация условий бактериальной экспрессии рекомбинантного белка АІМР1/р43 для повышения выхода и концентрации стабильного нативного белка в растворе. **Методы.** Культивирование в бактериальной системе экспрессии; металл-хелатирующая аффинная хроматография, гель-электрофорез. **Результаты.** Исследовано влияние концентрации индуктора синтеза целевого белка на его конечный выход и установлены оптимальные время и температура культивирования бактериальной культуры после добавления индуктора. Предложена оптимальная схема культивирования штамма *Escherichia coli* BL21(DE3)RIL для достижения высокого уровня выхода рекомбинантного белка в растворимой форме. **Выводы.** По полученным результатам было установлено, что растворимость рекомбинантного АІМР1/р43 существенно повышается при уменьшении концентрации ИПТГ до 0,5 мМ, понижении температуры до 25 °С и увеличении времени культивирования до 8 ч. Это открывает перспективу получения белка АІМР1/р43 в препаративных количествах для дальнейших структурных исследований и внедрения как нового продукта молекулярной биотехнологии.

Ключевые слова: белок АІМР1/р43, бактериальная система экспрессии, оптимизация экспрессии.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М. Мир. – 2002. – 589 с.
2. Francis D.M., Page R. Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. Curr Protoc Protein Sci. – 2010. – Aug;Chapter 5:Unit 5.24.1–29.
3. Wolfe C.L., Warrington J.A., Davis S., Green S., Norcum M.T. Isolation and characterization of human nuclear and cytosolic multisynthetase complexes and the intracellular distribution of p43/EMAPII // Protein Sci. – 2003.–12, № 10. – P. 2282–2290.
4. Ivanova Iu.L., Cherni N.E., Popenko V.I., Filonenko V.V., Vartanian O.G. Comparative study of localization of tryptophanyl-tRNA-synthetase and components



of high molecular weight aminoacyl-tRNA-synthetase complex in animal cells // Mol. Biol. (Mosk).—1993. — 27, № 3. — P. 666–684.

5. Popenko V.I., Ivanova J.L., Cherny N.E., Filonenko V.V., Beresten S.F., Wolfson A.D., Kisselev L.L. Compartmentalization of certain components of the protein synthesis apparatus in mammalian cells // Eur. J. Cell. Biol. — 1994. — 65, № 1.—P. 60–69.

6. Quevillon S., Agou F., Robinson J-C., Mirande M. The p43 component of the mammalian multi-synthetase complex is likely to be the precursor of the endothelial monocyte-activating polypeptide II cytokine// J. Biol. Chem. — 1997. — 272, № 51. — P. 32573–32579.

7. 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// Exp. Oncol. — 2004. — 26, № 4. — P. 250–255.

8. Lozhko D., Stanek J., Kazimierczuk K., Zawadzka-Kazimierczuk A., Kozminski W., Zhukov I., Kornelyuk A.¹H, ¹³C, and ¹⁵N chemical shifts assignments for human endothelial monocyte-activating polypeptide EMAP II// Biomol. NMR Assign. — 2013. — 7, № 1. — P. 25–29.

9. Renault L., Kerjan P., Pasqualato S., Menetrey J., Robinson J.C., Kawaguchi S., Vassylyev D.G., Yokoyama S., Mirande M., Cherfils J. Structure of the EMAP II domain of human aminoacyl-tRNA synthetase complex reveals evolutionary dimer mimicry // EMBO J. — 2001. — 20, № 3.—P. 570–578.10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — 227, № 5259. — P. 680–685.

11. Wright P.E., Dyson H.J. Intrinsically unstructured proteins: Reassessing the protein structure-function paradigm // J. Mol. Biol. — 1999. — 293, N 2. — P. 321–331.

12. Dyson H.J., Wright P.E. Intrinsically unstructured proteins and their functions // Nat. Rev. Mol. Cell Biol.—2005.—6, N 3.—P. 197–208.

13. Бабенко Л.А., Скоробогатов О.Ю., Дубровський О.Л., Корнелюк О.І. Оптимізація бактеріальної експресії протипухлинного цитокіна ЕМАР II в клітинах *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE, Мікробіологія і біотехнологія. — 2010. — № 3, С. 21–31.

Стаття надійшла до редакції 12.02.2015 р.

