

УДК 612.015.1:577.152.08

В.Н. Заец, В.О. Китап, В.В. Рушак, О.В. Максимчук, Н.А. Чашин

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03680, Украина, тел.: +38 (044) 526 11 69,
e-mail: prima@imbg.org.ua

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ЦИТОХРОМА P450 2E1 МЫШИ В *ESCHERICHIA COLI*

Цель. Клонировать кДНК гена цитохрома P450 2E1 мыши и получить экспрессию клонированной кДНК в E. coli. Методы. Полимеразная цепная реакция, методы клонирования, электрофорез, вестерн-блот анализ. Результаты. При клонировании кДНК гена цитохрома P450 2E1 мыши были использованы экспрессирующий вектор pCWOri+ и штамм E. coli DH5α. Для получения экспрессии рекомбинантного цитохрома P450 2E1 проведена модификация последовательности кДНК гена, кодирующей N-концевой фрагмент белка, приводящая к делеции последовательности с 3 по 23 аминокислотный остаток, нуклеотидной замене во втором кодоне аланина (GCG на GCT) и увеличению содержания АТ в 6 последующих кодонах за счет молчащих замен. Выводы. Впервые была клонирована с использованием экспрессирующего вектора pCWOri+ кДНК гена цитохрома P450 2E1 мыши (с указанной модификацией) и получена его экспрессия в E. coli.

Ключевые слова: цитохром P450 2E1, гетерологическая экспрессия в E. coli, рекомбинантный белок Cyp2E1.

Микросомальный белок цитохром P450 2E1 (Cyp2E1) принадлежит к суперсемейству цитохромов P450 — гемсодержащих монооксигеназ, метаболизирующих большинство поступающих в организм человека и животных ксенобиотиков [4, 10]. Субстратами Cyp2E1 являются преимущественно небольшие гидрофобные (липофильные) химические соединения, такие как спирты, кетоны, альдегиды, нитрозоамины, ароматические и галогенсодержащие углеводороды, многие из которых входят в состав косметических, лекарственных средств, продуктов питания, а также промышленных и бытовых отходов, загрязняющих окружающую среду [2, 6]. Известна роль Cyp2E1 в метаболической активации протоксифенов, проканцерогенов и в образовании повреждающих клетки свободных радикалов кислорода и гидроперекисей. Показано участие фермента в патогенезе сахарного диабета, алкогольном повреждении печени, болезни Альцгеймера и др. [2, 8]. Таким образом, выяснение

© В.Н. Заец, В.О. Китап, В.В. Рушак, О.В. Максимчук, Н.А. Чашин, 2012



структурно-функциональных характеристик Сур2Е1 особенно важно в таких областях, как фармакология, токсикология, а также при лечении и профилактике развития многих патологических процессов [7, 11].

Для изучения структурных и функциональных свойств Сур2Е1 необходим гомогенный фермент в препаративном количестве. Наиболее перспективным способом получения большого количества гомогенного белка является генно-инженерный метод. В настоящее время индивидуально чистые функционально активные формы многих цитохромов Р450 получены в различных гетерологичных системах — бактериях, дрожжах, бакуловирусах и клетках животных [7, 9, 15]. Наиболее предпочтительной считается бактериальная система *E. coli*, преимуществом которой по сравнению с другими системами является наличие ряда высокоэффективных экспрессирующих векторов, возможность быстрого получения большого количества исследуемых белков в гомогенном состоянии, простота их выделения и очистки, легкость проведения мутагенеза, а также относительная дешевизна бактериальных сред [9].

Целью настоящей работы является получение рекомбинантного белка Сур2Е1 мыши в гетерологичной системе *E. coli* для исследования его структурно-функциональных и биохимических свойств.

Материалы и методы

Для скрининга рекомбинантных клонов и экспрессии кДНК гена *Cyp2e1* использовали генноинженерный штамм *E. coli* DH5 α (*supE44* Δ *lacU169* (ф80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*).

Модификацию и амплификацию модифицированной кДНК гена *Cyp2e1* проводили методом ПЦР с помощью прямого 5'-ctcctcgtacatatg gctaaacaatttatcgttcttggaacctgccc-3' и обратного 5'-tggtggtgaagcttttatgacgaggaatgacacaga-3' праймеров в буферной смеси, содержащей 2 мМ хлорида магния, 200 мкМ каждого dNTP, 1 мкМ праймеров, 50 нг матрицы и 2 U Taq полимеразы фирмы «Fermentas» (Литва). Первоначальная денатурация матрицы проводилась в течение 3 мин при 94 °С. Последующие 30 циклов реакции состояли из этапов денатурации в течение 30 сек. при 94 °С, отжига в течение 30 сек. при 59 °С и элонгации в течение 1 мин. при 72 °С. Последний этап синтеза проводили в течение 5 мин. при 72 °С.

Компетентные клетки получали согласно методу Нишимуры и соавт.[13]. Все процедуры по клонированию кДНК гена *Cyp2e1* мыши — рестрикцию, лигирование, трансформацию и выделение плазмидной ДНК — проводили с помощью ферментов фирмы «Fermentas» (Литва) в соответствии с [14]. Для клонирования использовали вектор pCWOri+, любезно предоставленный доктором Ф. Генгерихом (Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, USA).

Индукцию экспрессии рекомбинантного гена *Cyp2e1* в культуре *E. coli* и выделение мембран из бактериальных клеток проводили согласно [6].



Трансформированные рекомбинантной плазмидой компетентные клетки *E. coli* DH5 α выращивали на 1,5% агаризованной питательной среде LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), в течение ночи при 37 °С. Трансформированные колонии переносили в жидкую среду LB с ампициллином (100 мкг/мл) и инкубировали при 37 °С и 170 оборотах в минуту в течение ночи. На следующий день ночную культуру инокулировали в соотношении 1:1000 в среду TB [14], содержащую ампициллин (100 мкг/мл) и микроэлементы (100 мл 4000-стокового раствора содержат 2,7 г FeCl₃ · 6H₂O, 0,2 г ZnCl₂ · 4H₂O, 0,2 г CoCl₂ · 6H₂O, 0,2 г Na₂MoO₄ · 2H₂O, 0,1 г CaCl₂ · 2H₂O, 0,1 г CuCl₂ и 0,05 г H₃BO₃, растворенных в 1,2 М HCl) и инкубировали 3–4 часа в тех же условиях до оптической плотности A₆₀₀=0,6–0,8 ОЕ. Затем в культуру добавляли предшественник гема аминоклевуленовую кислоту до конечной концентрации 0,5 мМ и проводили индукцию экспрессии рекомбинантного гена *Cyp2e1* 1 мМ IPTG. Индуцированную бактериальную культуру инкубировали на шейкере в течение 48 часов при 30 °С и 160 об/мин. Клетки осаждали при 4000 об/мин в течение 5 минут, отмывали в калий-фосфатном буфере, рН 7,5, содержащем 0,15 М хлорид натрия, взвешивали и суспендировали в 2 объемах (v/w) 75 мМ Трис-хлоридного буфера, рН 7,5, содержащего 250 мМ сахарозы и 0,25 мМ ЭДТА.

Для получения мембран отмытые бактериальные клетки суспендировали в 100 мМ Трис-ацетатном буфере, рН 7,6, содержащем 500 мМ сахарозы, 0,5 мМ ЕДТА, из расчета 5 мл буфера на 100 мл культуральной среды. Суспензию клеток разбавляли равным объемом бидистиллированной воды, добавляли к ней лизоцим до концентрации 0,1 мг/мл и инкубировали 1 час на шейкере при мягком перемешивании при 4 °С. Сферопласты осаждали при 5000 об/мин в течение 10 минут, взвешивали и суспендировали в 100 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,4, содержащем 6 мМ ацетат магния, 20% глицерин и 0,1 мМ ДТТ в соотношении 1 мл буфера на 0,5 г сферопластов. К суспензии сферопластов добавляли ингибиторы протеаз ПМСФ и леупептин до концентрации 1 мМ и 2 мкМ, соответственно, после чего сферопласты лизировали ультразвуком на ультразвуковом дезинтеграторе 3 раза по 30 сек. Полученный лизат осветляли центрифугированием при 10000 об/мин при 4 °С в течение 10 мин. Мембраны из осветленного лизата осаждали при 100000 g в течение 90 мин. Осажденные мембраны суспендировали в минимальном объеме 100 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7,4, содержащего 6 мМ ацетат магния, 20% глицерин и 10 мМ β-меркаптоэтанол.

Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия проводили по методу Лэммли с использованием 4% концентрирующего и 12% разделяющего гелей [14]. Разделенные в ДДС-ПААГ белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану BA-85 методом полусухого активного электропереноса с помощью прибора CSL Semi Dry Blotting Units (Clever Scientific Ltd, Велико-

британия) при силе тока 200 мА в течение 40 минут. Для иммуноблот-анализа использовали кроличьи поликлональные антитела к Сур2Е1 мыши, полученные в лаборатории [12], и вторичные anti-Rabbit антитела фирмы “Sigma” (США), конъюгированные с пероксидазой хрена. Для предупреждения неспецифичного связывания мембраны обрабатывали 5% раствором сухого молока в буфере TBST. Визуализацию белковых полос проводили хемилюминисцентным методом с использованием в качестве субстратов люминола, р-кумаровой кислоты и пероксида водорода согласно протокола ECL Western Blotting («Amersham», Англия). Экспозицию выполняли на рентгеновской пленке CP-BU («AGFA», Бельгия).

Результаты и обсуждение

Ранее на матрице выделенной из клеток печени мыши тотальной РНК нами была получена суммарная кДНК полиА-содержащих мРНК, которая была использована для праймерспецифичного ПЦР-синтеза полноразмерной кДНК гена микросомального белка цитохрома P450 2E1 [1]. Амплифицированная последовательность была клонирована в векторе рЕТ24а, широко используемом для экспрессии экзогенных белков в *E. coli*. Однако попытки получить экспериментально определяемый уровень экспрессии белка в совместимых с данным вектором штаммах *E. coli* BL21 (DE3), С41 и Rosetta, трансформированных полученной конструкцией рЕТ24а-Сур2Е1, оказались безуспешными [12]. Данные согласуются с работами других авторов, указывающими на то, что токсичные для бактериальной клетки цитохромы P450 млекопитающих крайне трудно получить в экспрессирующих векторах серии рЕТ, поскольку высокий уровень экспрессии рекомбинантных ферментов в данных векторах приводит либо к гибели клеток, либо к накоплению синтезированных белков в тельцах включения вследствие нарушения их фолдинга [3].

Анализ используемых для гетерологичной экспрессии в *E. coli* плазмидных векторов показал, что наиболее подходящим для экспрессии цитохромов P450 млекопитающих является разработанный в лаборатории Дальквиста вектор рCWOgi+, содержащий два тандемно расположенных индуцируемых *tac* промотора и ориджин репликации плазмиды рBR322 [3, 5]. Было показано также, что для эффективной экспрессии клонированных кДНК генов цитохромов P450 требуется модификация их нуклеотидной последовательности, кодирующей N-концевой фрагмент соответствующих белков. Модификация заключается в замене кодона второй аминокислоты на наиболее часто встречаемый в белках *E. coli* кодон аланина GCT. Кроме этого, в последующих нескольких кодонах кодируемой последовательности необходимо увеличение содержания АТ за счет молчащих замен, что снижает потенциал синтезированных мРНК к формированию вторичной структуры, препятствующей их связыванию с рибосомами [3, 9]. Данная модификация, часто в сочетании с делецией нуклеотидной последовательности первых 10–30 аминокислот N-концевой



сигнальной последовательности белков, а также использование вектора pCWOri+ позволили получить большинство каталитически активных рекомбинантных изоформ цитохромов P450 млекопитающих, в том числе Cyp2E1 кролика и человека [7, 9, 15].

Данный подход был использован нами для получения экспрессии рекомбинантного гена цитохрома P450 2E1 мыши и наработки соответствующего гетерологичного белка в клетках *E. coli*. Модификацию кДНК гена *Cyp2e1* и ее наработку для клонирования в вектор pCWOri+ проводили методом ПЦР на матрице рекомбинантной плазмиды pET24a-Cyp2E1. Для этого нами были синтезированы ограничивающие полную последовательность гена прямой и обратный праймеры, из которых прямой праймер нес замену второго кодона GCG на GCT и делецию нуклеотидной последовательности следующих 21 N-концевых аминокислотных остатков белка. Кроме того, для повышения AT содержания в первых кодонах модифицированной последовательности кДНК гена *Cyp2e1* нами были спроектированы в прямом праймере замены нуклеотидов в 4, 5, 7 и 8 кодонах, не меняющие аминокислотную последовательность белка Cyp2E1 (рис. 1.А).

Для встраивания кДНК гена в pCWOri+ в прямой праймер был введен сайт рестрикции эндонуклеазы NdeI, совпадающий с иницирующим кодоном ATG, а в обратный — эндонуклеазы HindIII, следующий непосредственно за стоп кодоном. После ПЦР-синтеза на матрице плазмиды pET24a-Cyp2E1 амплифицированный и очищенный в агарозе ДНК-фрагмент клонировали по этим сайтам рестрикции в вектор pCWOri+ (рис. 1.Б). В результате была получена рекомбинантная плазида pCW/ Δ Cyp2E1 с модифицированной последовательностью кДНК *Cyp2e1* мыши. Из рис. 2 и рис. 3 видно, что как амплифицированный, так и клонированный в плазмиде pCWOri+ фрагменты одинаковы по размеру и равны примерно 1500 пар оснований, что соответствует длине кДНК гена *Cyp2e1*.

Следует отметить, что любая модификация последовательности кДНК генов цитохромов P450 еще не гарантирует эффективный синтез кодируемых ими ферментов. Это связано с тем, что на экспрессию белков может оказывать влияние состав последовательности клонируемой ДНК. Кроме того, показано, что экспрессия цитохромов P450 в клетках *E. coli* зависит от используемых штаммов бактерий. Наибольший уровень экспрессии клонированных цитохромов P450 был получен в штамме DH5 α [6]. Поэтому в данной работе мы использовали этот штамм, а также наиболее удачный вариант модификации кДНК цитохрома P450 2E1 человека, обеспечивающий самый высокий уровень экспрессии белка в векторе pCWOri+ [6]. Для выявления экспрессии рекомбинантного белка Cyp2E1 в клетках DH5 α , трансформированных полученной нами рекомбинантной плазмидой pCW/ Δ Cyp2E1, были использованы специфичные к Cyp2E1 мыши поликлональные антитела кролика, полученные ранее в нашей

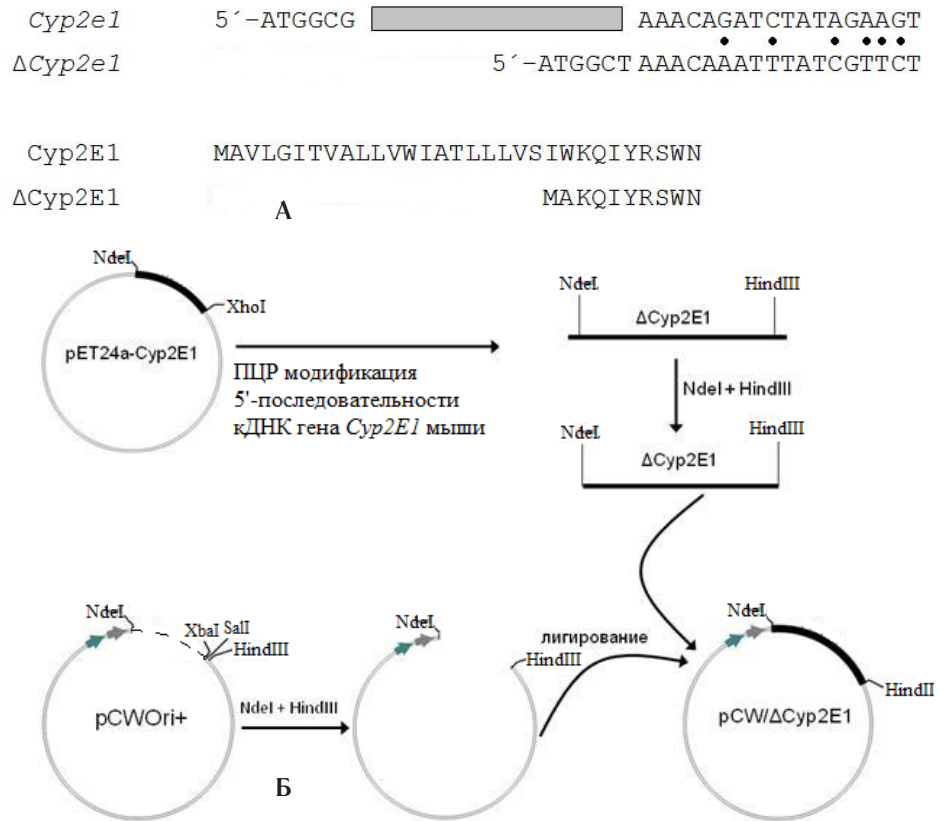


Рис. 1. Клонирование кДНК цитохрома P450 2E1 в векторе pCWOri+.

А — модификация нуклеотидной последовательности кДНК цитохрома P4502E1 мыши, кодирующей N-концевую последовательность белка: *Cyp2e1* — нативная нуклеотидная и аминокислотная последовательности цитохрома P4502E1; $\Delta Cyp2E1$ — модифицированная нуклеотидная и аминокислотная последовательности цитохрома P4502E1. Черточками обозначены делетированные нуклеотиды и соответствующие им аминокислоты в модифицированной N-концевой последовательности *Cyp2e1*. Точками над модифицированной нуклеотидной последовательностью *Cyp2e1* обозначены нуклеотидные замены, не изменяющие первичную структуру белка.

Б — схема клонирования кДНК гена цитохрома P4502E1 мыши в векторе pCWOri+.

Fig. 1. Cloning of cytochrome P450 2E1 cDNA in the vector pCWOri+.

A — Modification of the mouse cytochrome P450 2E1 gene cDNA nucleotide sequence encoding the N-terminal amino acid sequence of the protein: *Cyp2e1* and $\Delta Cyp2e1$ — native and modified cytochrome P450 2E1 gene cDNA nucleotide sequence; *Cyp2E1* and $\Delta Cyp2E1$ — native and modified cytochrome P450 2E1 amino acid sequence. Rectangular box in the native nucleotide sequence of *Cyp2e1* cDNA shows nucleotides deleted in the modified N-terminal sequence of the *Cyp2e1* protein. The points under the modified *Cyp2e1* nucleotide sequence show nucleotide substitutions which do not alter the primary structure of protein.

B — Scheme of the mouse cytochrome P450 2E1 gene cDNA cloning into expression vector pCWOri+. Modified by PCR *Cyp2e1* cDNA was restricted with NdeI - HindIII enzymes and ligated at sticky ends into plasmid vector pCWOri+ cut by the same enzymes. In the plasmid construct pCW/ $\Delta Cyp2E1$ created by us *Cyp2e1* cDNA is located under two inducible tac promoters, which direct its transcription.



лаборатории [12]. На рис. 4 приведены результаты иммуноблот-анализа белкового состава тотального клеточного лизата трансформированных рекомбинантной плазмидой и индуцированных IPTG бактериальных клеток *E. coli* DH5 α , а также выделенной из этих клеток мембранной фракции.

Рис. 2. ПЦР ампликон кДНК *Cyp2e1* мыши, синтезированный с помощью модифицирующих праймеров на матрице рекомбинантной плазмиды pET24a-Cyp2E1

- 1 – ДНК маркер (GeneRuler™100bp DNA Ladder, «Fermentas», Литва);
2 – ПЦР ампликон кДНК *Cyp2e1* мыши

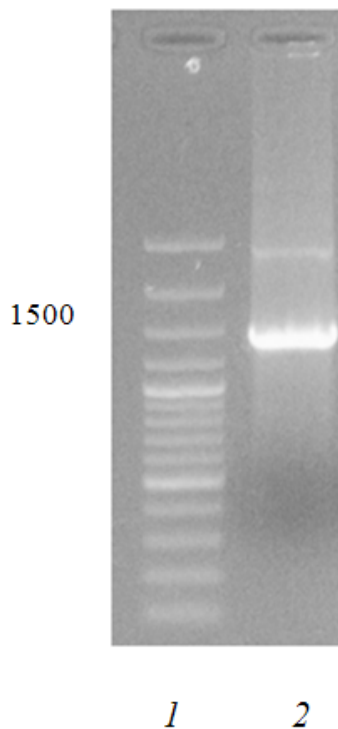


Fig. 2. PCR amplicon of mouse *Cyp2e1* cDNA synthesized by using of modifying primers on the matrix of the recombinant plasmid pET24a-Cyp2E1

- 1 – DNA marker (GeneRuler™100bp DNA Ladder, «Fermentas», Lithuania),
2 – PCR amplicon of mouse *Cyp2e1* cDNA.

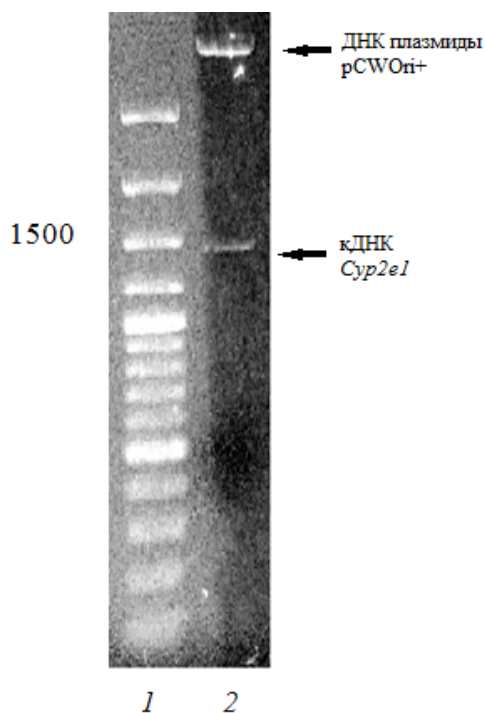


Рис. 3. Рестриктивный анализ рекомбинантной плазмиды pCW/ Δ Cyp2E1

- 1 – ДНК маркер (GeneRuler™100bp DNA Ladder, «Fermentas», Литва);
2 – ДНК рекомбинантной плазмиды pCW/ Δ Cyp2E1, обработанной рестриктазами NdeI-HindIII

Fig. 3. Restriction analysis of recombinant plasmid pCW/ Δ Cyp2E1

- 1 – DNA marker (GeneRuler™100bp DNA Ladder, «Fermentas», Lithuania),
2 – DNA of the recombinant plasmid pCW/ Δ Cyp2E1 treated with restriction enzymes NdeI-HindIII.

Рекомбинантний очищений цитохром P450 2E1 человека был взят нами в качестве контроля, поскольку полученные нами антитела к Cyp2E1 мыши были также кросс-специфичны и к этому цитохрому. Как видно из иммуноблота, модифицированная и клонированная нами в векторе pCWOg1+ кДНК гена *Cyp2e1* эффективно экспрессируется в бактериальной культуре, о чем свидетельствует наличие синтезированного Cyp2E1 мыши как в клеточном лизате, так и в мембранной фракции *E. coli*.

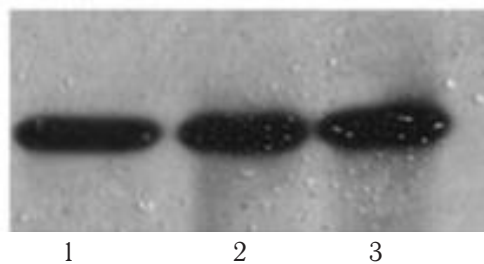


Рис. 4. Экспрессия рекомбинантного Cyp2E1 мыши в индуцированных IPTG клетках *E. coli* DH5α, трансформированных плазмидой pCW/ΔCyp2E1. Иммуноблот-анализ с использованием поликлональных анти-Cyp2E1 антител
1 — суммарный лизат клеток *E. coli* DH5α; 2 — мембранная фракция клеток *E. coli* DH5α; 3 — рекомбинантный Cyp2E1 человека

Fig. 4. Western blot analysis of recombinant mouse cytochrome P450 2E1 expressed in *E. coli* DH5α cells, transformed with the pCW/ΔCyp2E1 plasmid and induced with IPTG

1 — the total protein lysate of *E. coli* DH5α cells; 2 — protein membrane fraction of *E. coli* DH5α cells; 3 — control-recombinant human cytochrome P450 2E1.

Таким образом, в результате проделанной работы нами модифицирована и клонирована кДНК гена цитохрома P450 2E1 мыши и показана ее экспрессия в клетках *E. coli* DH5α. Дальнейшим направлением наших работ является секвенирование клонированной последовательности и оптимизация экспрессии Cyp2E1 в клетках *E. coli* для наработки фермента и исследования его структурных и функциональных свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Максимчук О.В., Данко І.М., Росохацька І.В., Чашин М.О. Експресія гена *Cyp2e1* у клітинах печінки мишей під впливом низьких доз радіації // Біополімери і клітина. — 2002. — 18, № 6. — С. 518–521.
2. Пентюк О.О., Качула С.О., Герич О.Х. Цитохром P450 2E1. Поліморфізм, фізіологічні функції, регуляція, роль у патології // Укр. біохім. журн. — 2004. — 76, № 5. — С.16–28.
3. Barnes H.J. Maximizing expression of eucariotic cytochrome P450s in *Escherichia coli* // Proc. Natl. Acad. Sci. — 1991. — 88, № 13. — P. 3–14.



4. Enzyme systems that metabolizes drugs and other xenobiotics / edited by C. Ioannides. — Chichester: John Wiley and Sons, Ltd., UK, 2001. — 566 p.
5. *Gegner J. A. and and Dahlquist F.W.* Signal transduction in bacteria: CheW forms a reversible complex with protein kinase CheA // *Methods Enzymol.* — 1996. — 72. — P. 750–754.
6. *Gillam E.M.J., Guo Z. and Guengerich F.P.* Expression of modified human cytochrome P450 2E1 in *Escherichia coli*, purification, and spectral and catalytic properties // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1994. — 312, № 1. — P.59–66.
7. *Gillam E.M.J.* Human cytochrome P450 enzymes expressed in bacteria: reagents to probe molecular interactions in toxicology // *Clinic. Exp. Pharm. Physiol.* — 1998. — 25, № 11 — P. 877–886.
8. *Gonzalez F.J.* Role of cytochrome P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1 // *Mutat. Res.* — 2005. — 569, № 1–2.— P. 101–110.
9. *Guengerich F.P., Gillam E.M.J., and Shimada T.* New applications of bacterial systems to problems in toxicology // *Crit. Rev. Toxicol.* — 1996. — 26, № 5. — P. 551–583.
10. *Guengerich F.P.* Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity // *The AAPS Journal.* — 2006. — 8, № 1. — P. 101–110.
11. *Kumar S.* Engineering cytochrome P450 biocatalysts for biotechnology, medicine and bioremediation // *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* — 2010. — 6, № 2. — P. 115–131.
12. *Maksymchuk O.V., Tykhonkova I.A., Chaschin M.O.* Heterological expression of mice Cytochrome P450 2E1 gene in *Escherichia coli* // 2-nd Polish-Ukrainian conference “Microbiology in the XXI century” (24-26 Sept. 2007, Warsaw). — Warsaw, 2007 — P. 251.
13. *Nishimura A., Morita M., Nishimura Y. and Sugino G.* A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells // *Nucl. Acids Res.* — 1990. — 18, № 20. — P. 6169.
14. *Sambrook J., Fritsch T., Maniatis T.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* — 2th ed. — New York: Cold Spring Harbor, 1989. — 545 p.
15. *Yun C.-H., Yim S.-K., Kim D.-H. and Ahn T.* Functional expression of human cytochrome P450 enzymes in *Escherichia coli* // *Curr. Drug Metab.* — 2006. — 7, № 4. — P. 411–429.

Стаття надійшла до редакції 19.03.2012 р.



В.М. Заєць, В.О. Кітам, В.В. Рушак, О.В. Максимчук, М.О. Чашин

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Академіка Заболотного 150,
Київ, 03680, Україна, e-mail: prima@imbg.org.ua

ГЕТЕРОЛОГІЧНА ЕКСПРЕСІЯ РЕКОМБІНАНТНОГО ЦИТОХРОМУ P450 2E1 МИШІ В *ESCHERICHIA COLI*

Реферат

Мета. Клонувати кДНК гена цитохрому P450 2E1 миші та отримати експресію клонованої кДНК в *E. coli*. **Методи.** Полімеразна ланцюгова реакція, методи клонування, електрофорез, вестерн-блот аналіз. **Результати.** При клонуванні кДНК гена цитохрому P450 2E1 миші були використані експресуючий вектор pCWOri+ та штам *E. coli* DH5 α . З метою отримання експресії рекомбінантного цитохрому P450 2E1 проведено модифікацію послідовності кДНК гена, яка кодує N-кінцевий фрагмент білку, що призводить до делеції послідовності з 3 по 23 амінокислотний залишок, нуклеотидної заміни у другому кодоні аланіну (GCG на GCT) та збільшення вмісту AT у 6 подальших кодонах за рахунок мовчазних заміन. **Висновки.** Вперше було клоновано із використанням експресуючого вектору pCWOri+ кДНК гена цитохрому P450 2E1 миші (із вказаною модифікацією) та отримано його експресію в *E. coli*.

Ключові слова: цитохром P450 2E1, гетерологічна експресія в *E. coli*, рекомбінантний білок Cyp2E1.

V. Zayets, V. Kitam, V. Rushchak, O. Maksymchuk, M. Chashchyn

Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, 150,
Zabolotnogo str., Kyiv, 03680, Ukraine, e-mail: prima@imbg.org.ua

HETEROLOGOUS EXPRESSION OF RECOMBINANT MOUSE CYTOCHROME P450 2E1 IN *ESCHERICHIA COLI*

Summary

Aim. The cloning of the mouse cytochrome P450 2E1 cDNA and obtaining of expression of cloned cDNA in *E. coli*. **Methods.** Polymerase chain reaction, cloning techniques, electrophoresis, Western blot. **Results.** For cloning of the mouse cytochrome P450 2E1 cDNA pCWOri+ expression vector and the strain *E. coli* DH5 α were used. To obtain recombinant



cytochrome P450 2E1 expression the cDNA gene sequence encoding the protein N-terminal fragment was modified, it was leading to deletion from 3 to 23 amino acid residues, nucleotide substitution in the second Ala codon (GCG to GCT) and increasing AT content in the next six codons by silent substitutions. Conclusions. For the first time by using the pCWOri+ expression vector the mouse cytochrome P450 2E1 cDNA (with this modification) was cloned and its expression was obtained in *E. coli*.

Key words: cytochrome P450 2E1, heterologous expression in *E. coli*, recombinant Cyp2E1.