

УДК 577.112.387.2

О.О. Бабич, Л.С. Солдатова, И.С. Разумникова

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА L-ФЕНИЛАЛАНИН-АММОНИЙ-ЛИАЗЫ В *ESCHERICHIA COLI* И ВЫДЕЛЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА*

Ген *pal*, кодирующий L-фенилаланин-аммоний-лиазу *Rhodospiridium toruloides* (GenBank: X12702.1), последовательность которого была оптимизирована, клонирован в состав экспрессирующего вектора pET28a. В результате оптимизации экспрессии, проводившейся по трем параметрам (тип индуктора, время индукции и температура индукции), был получен штамм-продуцент рекомбинантного белка L-фенилаланин-аммоний-лиазы с максимальной продуктивностью, составляющей 35 ± 1 % от общего клеточного белка при использовании в качестве индуктора 0,2 % лактозы (по Штудиеру), времени индукции 18 ч и температуры культивирования 37 °С. В результате определения растворимости L-фенилаланин-аммоний-лиазы было показано, что рекомбинантный белок на 99 % находится в нерастворимой фракции. Использование в качестве индуктора не 0,2 % лактозы, а 1 мМ ИПТГ не изменило растворимость белка, также не изменилась растворимость белка при культивировании бактерий при различных температурах: 25 и 37 °С.

L-фенилаланин-аммоний-лиаза, клонирование, экспрессия, рекомбинантный белок, индукция, L-фенилаланин, фенилкетонурия.

Введение

L-фенилаланин-аммоний-лиаза (PAL, КФ 4.3.1.5) катализирует реакцию обратимого дезаминирования аминокислоты L-фенилаланина до транс-коричной кислоты и аммиака [1]. PAL является ключевым ферментом метаболизма фенилпропаноидов в растениях и грибах, где она принимает участие в биосинтезе вторичных метаболитов (флавоноидов, фуранокумаринов, компонентов клеточной стенки) и существует в виде множественных изоформ [2]. Первая трехмерная структура PAL из дрожжей рода *Rhodospiridium toruloides* была определена с разрешением 2,1 Å. Молекулярная масса PAL составляет 76 880 Да. Молекула фермента состоит из 716 аминокислотных остатков. Оптимум pH для PAL обычно находится в диапазоне от 8,2 до 9,0. Температурный оптимум составляет от 35 до 55 °С в зависимости от источника получения фермента [3].

Фермент представляет интерес в качестве терапевтического средства при лечении фенилкетонурии, может быть использован как для прямой терапии фенилкетонурии, так и для производства полноценных продуктов питания, не содержащих фенилаланин [1, 2]. Кроме медицинского применения, PAL может быть использована в биотехнологии для производства L-фенилаланина из транс-коричной кислоты [3].

Представляется перспективным использование в качестве промышленного источника фермента штамма *Escherichia coli* – продуцента рекомбинантной L-фенилаланин-аммоний-лиазы [4, 5].

Escherichia coli является одним из наиболее эффективных и простых способов крупномасштабного получения рекомбинантных белков ввиду хорошо изученной генетики данного микроорганизма, доступности удобных экспрессионных векторных систем

и штаммов хозяина, простоты в использовании, низкой цены и высоких уровней экспрессии целевого гена, достигающих 40–45 % от общего клеточного белка [5, 6].

Целью настоящей работы является клонирование гена L-фенилаланин-аммоний-лиазы и его экспрессия в клетках *E. coli*, а также характеристика продукта его экспрессии.

Объекты и методы исследований

Реактивы. Акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, додецилсульфат натрия (ДДС-Na), бромфеноловый синий, гликоген, глицерин, 2-меркаптоэтанол, персульфат аммония, Твин 20, Тритон X-100, Трис-гидрохсиметиламинометан (Трис), N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), глюкоза фирмы Serva (Германия), агароза, бромистый этидий, бычий сывороточный альбумин (БСА), дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты, минеральное масло, протеиназа К, изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ), лизоцим фирмы Sigma (США), дрожжевой экстракт, бакто-триптон, агар фирмы Difco (Великобритания). Фенол, лизоцим, хлороформ, этанол, кислоты, щелочи, соли (квалификация х.ч. или о.с.ч.) фирмы «Реахим» (Россия), LB-среда фирмы Gibco BRL (США), канамицина сульфат – Курганского комбината «Синтез» (Россия), эндонуклеазы рестрикции NcoI и HindIII, T4 ДНК лигаза, Pfu-pol, Taq-pol фирмы «Сибэнзим» (Россия).

Бактериальные штаммы. Для экспрессии целевого белка использовались клетки *E. coli* штамма BL21[DE3]Star (Invitrogen, USA) с генотипом F-ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm mcl31 (DE3), содержащие в геноме λDe3 лизоген и мутацию mcl31.

* Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы, государственный контракт № 16.740.11.0239.

Мутированный ген *rne* (*rne131*) кодирует усеченную форму РНК-азы E, что уменьшает внутриклеточное разрушение м-РНК, приводя к увеличению ее ферментативной стабильности.

Плазмидные ДНК. Для экспрессии белков в клетках *E. coli* использовался вектор pET28a, содержащий промотор для полимеразы фага T7, *lac*-оператор, сайт связывания с рибосомальным комплексом (RBS), старт-кодон для трансляции клонированных фрагментов, полигистидиновый фрагмент, находящийся в рамке трансляции. Любая клонированная в векторе нуклеотидная последовательность будет экспрессироваться в виде белка, слитого с полигистидином, для удобства его дальнейшей очистки с использованием иммобилизованной металлоаффинной хроматографии.

Синтез гена осуществляли таким образом, чтобы он на своих концах содержал сайты рестрикции NcoI и HindIII и был предназначен для амплификации и последующей встройки области гена в полилинкер pET28a.

Амплификацию гена *pal* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Разработку олигонуклеотидных праймеров для амплификации гена проводили с помощью программы OLIGO (версия 3.3) с учетом данных о первичной структуре гена *pal*. В качестве матрицы для амплификации кодирующей области гена *pal* из *R. toruloides* использовали последовательность данного гена из баз данных GenBank (X12702.1). Праймеры содержали на 5'-концах дополнительные последовательности, включающие сайты рестрикции NcoI для прямого праймера и HindIII для обратного, и были предназначены для амплификации и последующей встройки структурной области гена в полилинкер экспрессирующего вектора pET28a по соответствующим сайтам. Обратный праймер был сконструирован таким образом, чтобы полученный ампликон не содержал стоп-кодона и обеспечивалась состыковка рамок считывания гена и последовательности *His₆*.

Полимеразную цепную реакцию проводили в 20–50 мкл раствора, приготовленного на основе десятикратного буфера для Taq-полимеразы, который содержал 200 мкМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов, 0,5 мкМ праймеров, 2 мМ MgSO₄, 10 нг матрицы, 2 единицы Taq ДНК-полимеразы и 0,1 единицы Pfu ДНК-полимеразы. Температуру отжига олигонуклеотидов рассчитывали по эмпирической формуле $T_m = 67,5 + 34[\%GC] - 395/n$, где %GC = (G+C)/n, n – число нуклеотидов. Анализ продуктов ПЦР проводили электрофорезом в 1 % геле агарозы.

Секвенирование проводилось по методу Сэнгера согласно протоколу производителя автоматического секвенатора ABI3730xl фирмы Applied Biosystems (USA) с использованием наборов для секвенирования BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit.

Гидролиз ДНК рестриктазами NcoI и HindIII. Гидролиз ДНК проводили в буферных растворах при оптимальных условиях инкубационной среды, рекомендуемых для каждого из ферментов фирмами-производителями. Полнота гидролиза контролируется электрофорезом в агарозном геле. Реакцион-

ную смесь очищали от продуктов реакции с помощью набора QuickClean.

Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля. Образцы ДНК разделяли методом электрофореза в трис-ацетатном буфере в блоке 0,7–0,8 %-го агарозного геля (Bio-Rad, США), содержащего 0,3 мкг/мл этидиум бромид, и анализировали по флуоресценции в ультрафиолете при длине волны 254 нм. Участки геля, содержащие интересующие фрагменты, вырезали и переносили в микроцентрифужные пробирки, после чего проводили элюцию фрагментов ДНК с помощью набора «Выделение ДНК из агарозных гелей» фирмы Boeringer Mannheim (Германия). В пробирку добавляли раствор перхлората натрия из расчета 400 мкл на 100 мг веса вырезанного геля. Полученную смесь нагревали до 65 °С, при этом агароза растворялась в солевом буфере. В суспензию вносили стеклянные микрошарики (Glass milk) из расчета 20 мкл на 100 мг веса геля. В солевом растворе ДНК, содержащаяся в геле, адсорбировалась на поверхности этих шариков. Далее шарики промывали (последовательное осаждение – ресуспендирование) один раз тем же солевым раствором и два раза 70%-ным этанолом. Десорбировали ДНК с шариков путем ресуспендирования в буфере TE (10 мМ Трис-НС1-буфер, pH 7.4; 1 мМ ЭДТА) из расчета 50 мкл на 100 мг веса геля.

Лигирование. Выделенные по описанной выше методике продукты гидролиза рестриктазами векторной ДНК и ампликона гена *pal* лигировали ДНК-лигазой фага T4. Коцентрации вектора и гена в реакционной смеси были равными 5 нг/мкл. Концентрация ДНК-лигазы фага T4 в реакционной смеси 5 ед/мкл. Реакцию проводили при 15 °С в течение 24 ч.

Приготовление компетентных клеток *E. coli* для трансформации. Для подготовки компетентных клеток к последующей трансформации методом электропорации брали отдельную колонию, выращенную на LB-агаре, и помещали в 5 мл LB-среды. Клетки растили в течение ночи при 37 °С и постоянном перемешивании (250 об/мин); 2 мл полученной ночной культуры помещали в 200 мл LB-среды. Клетки растили при 37 °С при постоянном перемешивании (250 об/мин) до ОП600 = 0,6, после чего осаждали центрифугированием в течение 10 мин на 4000 g при +4 °С. Клетки отмывали в деионизованной воде в исходном объеме с последующим центрифугированием. Процедура отмывки повторялась трижды. После отмывки осадок клеток ресуспендировали в малом объеме деионизованной воды и центрифугировали 30 с при 5000 об/мин на микроцентрифуге. К осадку клеток добавляли 3 объема (от объема клеточного осадка) 15 % раствора глицерина, осадок ресуспендировали и быстро замораживали в жидком азоте. Готовые к трансформации клетки хранили при –70 °С.

Трансформация клеток *E. coli*. Трансформацию компетентных клеток осуществляли методом электропорации. Для этого 2 мкл плазмидной ДНК с концентрацией 0,3–1 нг/мкл добавляли к 12 мкл компетентных клеток, перемешивали и проводили

электропорацию на генераторе высоковольтных импульсов ГВИ-1 в стерильных ячейках при электрическом импульсе напряженностью 10 кВ/см длительно-стью 4 мсек. После трансформации клетки помещали в 1 мл SOC-среды (2 % бакто-триптон, 0,5 % дрожжевой экстракт, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM глюкоза) и инкубировали в течение 40 мин при 37 °С. После инкубации 10–250 мкл клеточной суспензии высеивали на селективную LB-среду, содержащую канамицин (25 мкг/мл), для отбора рекомбинантных клонов.

Индукция экспрессии гена ИПТГ. Индукцию экспрессии генов, кодирующих рекомбинантный фермент, в штаммах продуцентах осуществляли с использованием ИПТГ в конечной концентрации 1 mM. Для этого единичную колонию штамма-продуцента инокулировали в стандартную жидкую среду LB, содержащую канамицин в концентрации 25 мкг/мл и 1 % глюкозу, и ферментировали при 37 °С в термостатированном шейкере роторного типа в течение ночи при 250 об/мин. После этого, измерив ОП600, культуру разводили стандартной жидкой средой LB, содержащей канамицин в концентрации 25 мкг/мл, до ОП600 = 0,1 оп.ед. и ферментировали в течение 2–3 ч при температуре 37 °С до ОП600 0,6–0,8. Далее культуру разделяли на 2 равные части, к одной из них добавляли ИПТГ до конечной концентрации 1 mM и ферментировали в течение 5 ч при температуре 25 или 37 °С, снимая через определенные временные интервалы аликвоты клеток для анализа. Аликвоты хранили при –20 °С.

Автоиндукция экспрессии 0,2 % лактозой. Для автоиндукции экспрессии по методу Штудииера [7] использовалась модифицированная среда РУР-5052, состоящая из 1 % пептона, 0,5 % дрожжевого экстракта, 50 mM Na₂HPO₄, 50 mM K₂HPO₄, 25 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,5 % глицерола, 0,05 % глюкозы и 0,2 % лактозы.

В среду РУР-5052, содержащую канамицин в концентрации 25 мкг/мл, инокулировали единичную колонию штамма-продуцента. После этого ферментировали при 25 или 37 °С в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об/мин в течение 32 или 18 ч или до отсутствия существенного изменения ОП600 за 1 ч. Далее отбирали аликвоту клеток на анализ. Аликвоты хранили при –20 °С.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ). Электрофорез клеточных лизатов и белков проводили с использованием диск-электрофореза в 10 % ПААГ в денатурирующих редуцирующих условиях по Лемли.

Разрушение бактериальных клеток в нативных условиях проводилось с использованием ультразвукового озвучивания. Для этого влажный осадок клеток из 300 мл культуральной среды ресуспендировали в 30 мл буфера (50 mM Трис-НСl, pH 8,0, 20 mM ЭДТА pH 8,0) и проводили озвучивание в течение 10 мин при следующих параметрах (амплитуда 60 %, время озвучивания 30 с, пауза 30 с, рабочая температура 4 °С). Контроль разрушения проводили методом высева клеток после разрушения на стандартную агаризованную среду LB, содержащую канамицин в концентрации 25 мкг/мл. После разрушения лизат клеток центрифугировали в течение 20 мин

при 15 000 g, полученный осадок и супернатант использовали для анализа локализации белка р17.

Компьютерные методы анализа данных. Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью персонального компьютера с использованием программ Lasergene v.7.1.0 (DNASar, США) и BioEdit v.5.0.9.

Поиск гомологичных последовательностей осуществляли с помощью программы BLAST2 (<http://www.ebi.ac.uk/blastall/>).

Сравнение аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы ClustalW1.8 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>).

Результаты и их обсуждение

Клонирование гена *pal* к клеткам *E. coli*. В связи со сложностью геномной организации гена *pal* (6 интронов) он был синтезирован согласно последовательности гена *pal*, выделенного из *R. toruloides* (GenBank: X12702.1). Ген обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NcoI и HindIII для получения липких концов.

Для клонирования в качестве вектора был выбран экспрессионный вектор рЕТ28а, предназначенный для экспрессии рекомбинантных белков в *E. coli* и содержащий в своем составе ген резистентности к канамицину. Кроме того, вблизи полилинкера вектор содержит последовательность, кодирующую His-Tag конец, что значительно облегчает проведение хроматографии на Ni-содержащем носителе. При подготовке к клонированию вектор обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NcoI и HindIII и очищали от продуктов реакции с помощью набора QuickClean. После гидролиза эндонуклеазами рестрикции у вектора появились липкие концы, комплиментарные концам гена *pal*.

Получение штамма-продуцента белка PAL. Методом электропорации плазмидной ДНК рЕТ28а, содержащей ген *pal*, кодирующий L-фенилаланин-аммоний-лиазу *Rhodospiridium toruloides* (GenBank: X12702.1), были трансформированы клетки *E. coli* штамма BL21[DE3]Star, содержащие в своем геноме ген, кодирующий полимеразу фага T7 под контролем индуцибельного бактериального промотора. Выбор данного штамма обусловлен тем, что он содержит лизоген DE3, несущий ген, кодирующий полимеразу фага T7 под контролем индуцибельного промотора lacUV5, необходимую для экспрессии гена, клонированного в плазмиде рЕТ28а. Кроме этого, данные клетки не содержат протеазу lon и несут мутацию в гене, кодирующем протеазу внешней мембраны OmpT.

Отсутствие этих двух протеаз уменьшает деградацию гетерологичных белков. Также этот штамм несет мутированный ген *gpe*, кодирующий усеченный вариант РНК-азы, что должно приводить к увеличению стабильности м-РНК в клетке вследствие уменьшения ее ферментативной деградации [8, 9].

В результате был получен штамм *E. coli* BL21[DE3]Star рЕТ28аPAL – продуцент белка L-фенилаланин-аммоний-лиазы *Rhodospiridium toruloides*. Штамм *E. coli* BL21[DE3]Star рЕТ28аPAL в дальнейшем будет называться BL21PAL.

Биосинтез рекомбинантного белка PAL клетками *E. coli* штамма BL21PAL после индукции экспрессии 1 mM ИПТГ. Для культивирования полученного

штамма-продуцента белка PAL использовали стандартную агаризованную LB-среду, содержащую канамицин в концентрации 25 мкг/мл и глюкозу в концентрации 1 %. Был оптимизирован уровень экспрессии фермента по времени и температуре индукции. Ферментацию проводили в 2-литровых колбах в 250 мл среды, содержащей канамицин в концентрации 25 мкг/мл, в термостатированной качалке роторного типа при 37 °C и 250 об/мин. В качестве индуктора использовали ИПТГ в концентрации 1 мМ. Индукцию экспрессии проводили, когда ОП600 культуры клеток достигла 0,6–0,8 оптических единиц. После этого через определенное время (от 15 мин до 1 ч) из культур клеток после индукции отбирали аликвоты для анализа. В качестве контроля использовали культуры клеток без индукции. Без индукции клетки растут по логарифмическому закону: до 0,6–0,8 оп.ед. наблюдается рост по линейной зависимости, далее до 3,8–4,2 оп.ед. происходит экспоненциальный рост, после чего наблюдается выход кривой роста на плато в стационарную фазу роста. После добавления к культуре клеток индуктора 1 мМ ИПТГ наблюдается замедление роста клеток, изменение количества клеток с 0,6 до 1,5 оп.ед. происходит за 4 ч, однако далее наблюдается начало экспоненциального роста культуры клеток с более поздним выходом на плато в стационарную фазу роста. При изучении динамики биосинтеза рекомбинантного белка PAL клетками *E. coli* после индукции экспрессии 1 мМ ИПТГ было показано, что максимальный уровень экспрессии гена *pal* в клетках *E. coli* штамма BL21PAL при индукции 1 мМ ИПТГ наблюдается после 3-часовой ферментации. При этом по данным денситометрического анализа выход белка составляет 32 % от общего клеточного белка (рис. 1). При проведении индукции экспрессии при температуре 25 °C наблюдался более длительный выход культур клеток в экспоненциальный рост, составивший при температуре индукции 25 °C – 9 часов.

При этом максимальный уровень экспрессии (32 %) для всех температур индукции оставался неизменным. Без индукции экспрессии не было обнаружено непреднамеренного синтеза рекомбинантного белка, «подтекания T7 промотора», часто наблюдаемого в данной системе экспрессии [10].

Биосинтез рекомбинантного белка PAL клетками E. coli штамма BL21PAL после автоиндукции экспрессии 0,2 % лактозой по методу Штудииера. Ферментацию проводили в 2-литровых колбах в 250 мл среды для автоиндукции RYP-5052, содержащей канамицин в концентрации 100 мкг/мл, в термостатированной качалке роторного типа при 250 об/мин в течение 18 ч при температуре 37 °C и в течение 32 ч при температуре 25 °C.

Средняя оптическая плотность (ОП600) культуры клеток *E. coli* штамма BL21PAL была одинаковой при разных температурах культивирования и составила 7 оп.ед. После проведения диск-электрофореза в ПААГ лизатов клеток *E. coli* штамма BL21PAL после автоиндукции экспрессии 0,2 % лактозой было осуществлено определение содержания белка PAL в клетках *E. coli* методом денситометрического анализа полученной электрофореграммы с использованием компьютерной программы TotalLab. В результате

денситометрического анализа было показано, что в клетках *E. coli* штамма BL21PAL белок PAL накапливается в количестве 35 % от общего клеточного белка при температуре ферментации 37 °C и 33 % при температуре 25 °C (рис. 2 и 3).

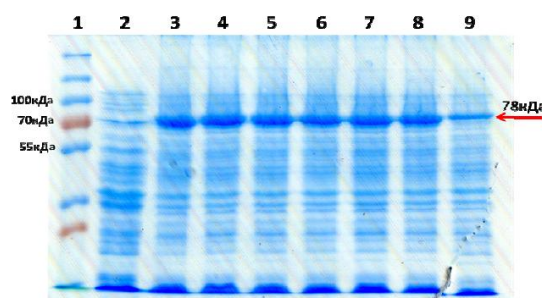


Рис. 1. Анализ лизатов клеток *E. coli* штамма BL21PAL после индукции экспрессии в различных условиях: 1 – маркер молекулярного веса PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas); 2 – отрицательный контроль (лизат клеток штамма-продуцента без добавления индуктора проведения индукции); 3 – лизат клеток *E. coli* штамма BL21PAL после индукции экспрессии 0,2 % лактозой по методу Штудииера при температуре 25 °C в течение 32 ч; 4 – лизат клеток *E. coli* штамма BL21PAL после индукции экспрессии 0,2 % лактозой по методу Штудииера при температуре 37 °C в течение 18 ч; 5 – лизат клеток *E. coli* штамма BL21PAL после индукции экспрессии 1 мМ ИПТГ при температуре 37 °C в течение 3 ч; 6 – лизат клеток *E. coli* штамма BL21PAL после индукции экспрессии 1 мМ ИПТГ при температуре 37 °C в течение 5 ч; 7 – лизат клеток *E. coli* штамма BL21PAL после индукции экспрессии 1 мМ ИПТГ при температуре 25 °C в течение 5 ч; 8 – лизат клеток *E. coli* штамма BL21PAL после индукции экспрессии 1 мМ ИПТГ при температуре 25 °C в течение 8 ч; 9 – лизат клеток *E. coli* штамма BL21PAL после индукции экспрессии 1 мМ ИПТГ при температуре 25 °C в течение 3 ч

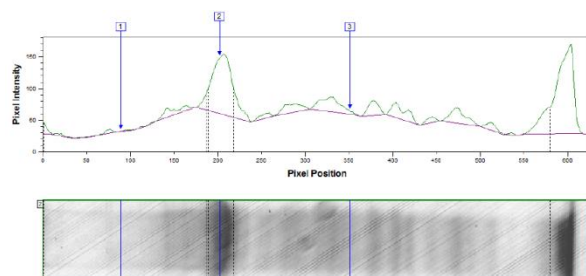


Рис. 2. Денситограмма лизата клеток *E. coli* штамма BL21PAL после индукции экспрессии 0,2 % лактозой по методу Штудииера при температуре 25 °C в течение 32 ч

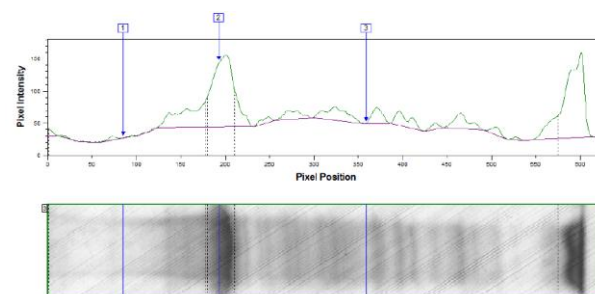


Рис. 3. Денситограмма лизата клеток *E. coli* штамма BL21PAL после индукции экспрессии 0,2 % лактозой по методу Штудииера при температуре 37 °C в течение 18 ч

Данный метод индукции экспрессии был выбран как более простая, эффективная и недорогая альтернатива классической индукции с использованием ИПТГ в системах экспрессии, основанных на лактозном опероне. При использовании автоиндукции не требуется ни следить за оптической плотностью культуры клеток, ни добавлять индуктор.

От момента инокуляции колонии в автоиндукционную среду до получения биомассы бактерий с ОП600 = 7–15 с синтезированным целевым белком проходит 15–20 ч.

Феномен автоиндукции экспрессии основан на механизмах, которые бактерии используют для регуляции использования источников углерода и энергии, находящихся в питательной среде. Если в питательной среде присутствует глюкоза, то катаболическая репрессия и исключение индуктора препятствуют поглощению лактозы *lac*-пермеазой, продуктом гена *lacY* [11, 12]. Когда ресурсы глюкозы исчерпываются, лактоза начинает поглощаться *lac*-пермеазой, внутри бактериальной клетки бета-галактозидаза превращает лактозу в естественный индуктор – аллолактозу [6]. Использование в качестве источника углерода и энергии химического вещества, не связанного с индукцией и лактозным опероном (например, глицерол), позволяет практически удвоить выход целевого белка в сравнении с эквивалентными количествами лактозы как первичного источника энергии. Это связано с тем, что Т7 РНК-полимераза настолько активна, что индукция может направить большую часть клеточной транскрипции и трансляции на продукцию целевого белка [13], которая может перекрываться со способностью метаболизировать лактозу для энергетических нужд. Глицерол не перекрывается с индукцией целевого белка и служит эффективным источником углерода и энергии. Присутствие в среде для автоиндукции 0,05 % глюкозы ускоряет процесс роста бактериальных клеток на начальных стадиях и одновременно блокирует индукцию 0,2 % лактозой, присутствующей в среде, а 0,5 % глицерол, также присутствующий в среде, является эффективным источником углерода и энергии.

При использовании автоиндукционной среды для биосинтеза рекомбинантного белка PAL в клетках *E. coli* максимальный уровень его экспрессии в штамме BL21PAL составил 35 % в сравнении с максимальным уровнем 32 % при индукции ИПТГ. Увеличение максимального уровня экспрессии при автоиндукции 0,2 % лактозой составило 7–8 % по сравнению с индукцией ИПТГ. Полученные данные говорят о том, что использование более простой и недорогой автоиндукции для синтеза рекомбинантного белка р17 приводит к аналогичным результатам, полученным при использовании в качестве индуктора 1 мМ ИПТГ, при этом биомасса бактерий и, следовательно, выход белка увеличиваются в 6–7 раз.

Определение растворимости рекомбинантного белка PAL при его синтезе в клетках *E. coli* штамма BL21PAL. Растворимость рекомбинантного белка PAL при его синтезе в клетках *E. coli* штамма BL21PAL была определена методом диск-электрофореза в ПААГ клеток *E. coli*, разрушенных после

проведения индукции экспрессии 0,2 % лактозой в течение 18 ч при 37 °С по Штудиеру, при этом анализировались осадок и супернатант, образовавшиеся после осаждения клеточных обломков.

Было показано, что 99 % рекомбинантного белка PAL, синтезированного в клетках *E. coli* штамма BL21PAL при индукции экспрессии в оптимальных условиях, находится в осадке, образовавшемся после осаждения клеточных обломков, и, возможно, лишь незначительное количество (1 %) находится в супернатанте (рис. 4).

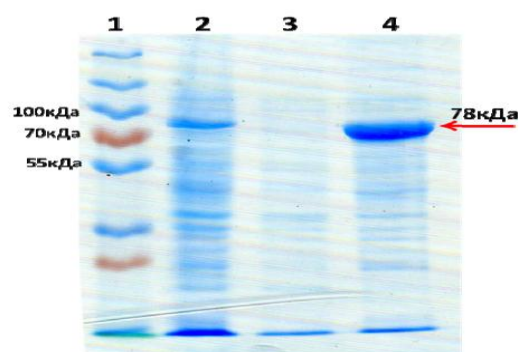


Рис. 4. Определение растворимости рекомбинантного белка PAL при его синтезе в клетках *E. coli* штамма BL21PAL: 1 – маркер молекулярного веса PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas); 2 – лизат клеток *E. coli* штамма BL21PAL, разрушенных с использованием ультразвука; 3 – супернатант, образовавшийся после центрифугирования лизата клеток *E. coli* штамма BL21PAL, разрушенных с использованием ультразвука; 4 – осадок, образовавшийся после центрифугирования лизата клеток *E. coli* штамма BL21PAL, разрушенных с использованием ультразвука

Использование в качестве индуктора не 0,2 % лактозы, а 1 мМ ИПТГ не изменило растворимость белка, также не изменило растворимость белка при индукции 0,2 % лактозой культивирование бактерий при различных температурах: 25 и 37 °С.

Накопление белка PAL в клетках штамма-производителя в нерастворимом виде косвенно говорит о его неправильной (не нативной) конформации (третичной структуре).

Полученные данные о растворимости не согласуются с данными мировой литературы, в которых показано, что при различных методиках экспрессии гена *pal*, кодирующего L-фенилаланин-аммоний-лиазу *Rhodospiridium toruloides* (GenBank: X12702.1), в клетках *E. coli* целевой фермент является растворимым. Вероятной причиной накопления белка PAL в клетках штамма-производителя в нерастворимом виде является использование для экспрессии гена с модифицированным составом кодонов. В результате оптимизации состава кодонов могли нарушиться участки, необходимые для замедления рибосом на границах фолдинга доменов, что могло привести к началу трансляции нового домена при незавершенном фолдинге предыдущего и к образованию нерастворимых агрегатов белка.

Таким образом, получен штамм *E. coli* – производитель рекомбинантной L-фенилаланин-аммоний-лиазы *Rhodospiridium toruloides*. В результате оптимизации экспрессии был получен максимальный уровень экспрес-

сии 35 % при индукции 0,2 % лактозой по методу Штудьера в течение 18 ч при температуре 37 °С. При экспрессии в клетках *E. coli* рекомбинантная L-фенил-

аланин-аммоний-лиаза являлась нерастворимой (образовывала тельца включения) при всех исследуемых условиях.

Список литературы

1. Sarkissian, C.N. Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria, where are we now? / C.N. Sarkissian, A. Gamez // *Mol. Genet. Metab.* – 2005. – № 86. – P. 22–26.
2. A different approach to treatment of phenylketonuria: Phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase / C.N. Sarkissian, Z. Shao, F. Blain, R. Peevers, H. Su, R. Heft, T.M.S. Chang, C.R. Scriver // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – № 96. – P. 2339–2344.
3. Biotransformation of trans-cinnamic acid to L-phenylalanine: Optimization of reaction conditions using whole yeast cells / C.T. Evans, K. Hanna, C. Payne, D. Conrad, M. Misawa // *Enzyme Microb. Technol.* – 1987. – № 9. – P. 417–421.
4. Baneyx, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* // *Curr Opin Biotechnol.* – 1999. – V. 10. – P. 411–421.
5. Hannig, G. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli* / G. Hannig, S.C. Makrides // *Trends in Biotechnology.* – 1998. – V. 16. – P. 54–60.
6. Beckwith, J. The operon: An historical account // F.C. Neidhardt (Ed.), *Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C. – 1987. – P. 1439–1452.
7. Studier, F.W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures // *Protein Expr Purif.* – 2005. – V. 41. – P. 207–234.
8. RNase E polypeptides lacking a carboxyl-terminal half suppress a mukB mutation in *Escherichia coli* / M. Kido, K. Yamanaka, T. Mitani, H. Niki, T. Ogura, S. Hiraga // *J Bacteriol.* – 1996. – V. 178. – P. 3917–3925.
9. Lopez, P.J. The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo / P.J. Lopez, I. Marchand, S.A. Joyce, M. Dreyfus // *Mol Microbiol.* – 1999. – V. 33. – P. 188–199.
10. Grossman, T.H. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability / T.H. Grossman, E.S. Kawasaki, S.R. Punreddy, M.S. Osburne // *Gene.* – 1998. – V. 209. – P. 95–103.
11. Inada, T. Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model / T. Inada, K. Kimata, H. Aiba // *Genes Cells.* – 1996. – V. 1. – P. 293–301.
12. Kimata, K. cAMP receptor protein-cAMP plays a crucial role in glucose-lactose diauxie by activating the major glucose transporter gene in *Escherichia coli* / K. Kimata, H. Takahashi, T. Inada, P. Postma, H. Aiba // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1997. – V. 94. – P. 12914–12919.
13. Studier, F.W. Use of bacteriophage T7 RNA-polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes / F.W. Studier, B.A. Moffatt // *J Mol Biol.* – 1986. – V. 189. – P. 113–130.

ГОУ ВПО «Кемеровский технологический институт
пищевой промышленности»,
650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47.
Тел./факс: (3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru

SUMMARY

O.O. Babich, L.S. Soldatova, I.S. Razumnikova

Cloning and expression of gene L-phenylalanine ammonia-lyase in *Escherichia coli* and allocation of recombinant protein

Gene *pal*, coding L-phenylalanine ammonia-lyase *Rhodospiridium toruloides* (GenBank: X12702.1) which sequence was optimized, was cloned into the structure of expressing vector pET28a. Optimization of the expression carried out by three parameters (inductor type, induction time and induction temperature) resulted in obtaining a strain-producer of recombinant protein phenylalanine ammonia-lyase with the maximum efficiency of 35±1 % from the total cellular protein when used as an inductor of 0,2 % of lactose (according to Shtudieru), induction time of 18 hours and cultivation temperature of 37 °C. As a result of determination of L-phenylalanine ammonia-lyase solubility it has been shown that recombinant protein is in insoluble fraction by 99 %. The use of 1 mM of IPTG as an inductor instead of 0,2 % of lactose, hasn't changed protein solubility. Protein solubility hasn't been changed as well when cultivating bacteria at various temperatures: 25 and 37 °C.

L-phenylalanine ammonia-lyase, cloning, expression, recombinant protein, induction, L-phenylalanine, phenylketonuria.

Kemerovo Institute of Food Science and Technology
47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia
Phone/Fax: +7(3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru

