

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің 60 жылдығына арналған «Сейфуллин оқулары– 13: дәстүрлерді сақтай отырып, болашақты құру» атты Республикалық ғылыми-теориялық конференциясының материалдары = Материалы Республиканской научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения – 13: сохраняя традиции, создавая будущее», посвященная 60-летию Казахского агротехнического университета имени С.Сейфуллина. - 2017. - Т.1, Ч.6. - С.149-152

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ PHOA В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

Кириллов С.О., Силаев Д.В., Хасенов Б.Б.

РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, г.Астана

На сегодняшний день в Казахстане активно проводятся научные исследования и диагностика с использованием иммунохимических методов, иммуноблотинга, иммуногистохимия, иммуноцитохимия и иммуноферментный анализ. Проводятся работы по разработке иммунотестов для диагностики инфекционных заболеваний медицинского и ветеринарного назначения. Однако часть компонентов (вторичные антивидовые антитела меченные ферментами, антитело связывающие белки, ферменты) при разработке тестов и при проведении исследований используется от зарубежных производителей (SIGMA-ALDRICH, ABCAM, ИМТЕК). Соответственно, актуальным является задача по получению реагентов для комплектации разрабатываемых тест-систем.

Иммунохимические методы анализа находят широкое применение в различных отраслях промышленности, диагностики, мониторинга окружающей среды и пищевой безопасности [1]. Принципиальным отличием иммунохимического анализа от других методов аналитической химии является использование специфических антител поликлонального, моноклонального и рекомбинантного происхождения [2]. Усовершенствование иммунохимических методов анализа стало возможным благодаря использованию ферментов в качестве меток для детектирования реакций антиген-антитело [3]. Для эффективного использования методов иммуноанализа с ферментным мечением понадобилась разработка процедур химического конъюгирования ферментов с иммунореагентами (прежде всего с антителами), которые бы сочетали высокий выход продукта, сохранение им иммунореактивности и высокой каталитической активности ферментной метки в составе получаемого конъюгата [4].

Щелочная фосфатаза - фермент класса гидролаз, катализирующий удаление 5'-фосфатных групп ДНК или РНК, а также расщепление макроэргических связей рибо- и дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Фермент широко используется в ИФА, гистохимии, вестерн блоттинге для ферментативной метки антигенов или антител [5].

Целью данной работы является клонирование и экспрессия в клетках *Escherichia coli* гена щелочной фосфатазы из *E. coli*.

Экспериментальная часть

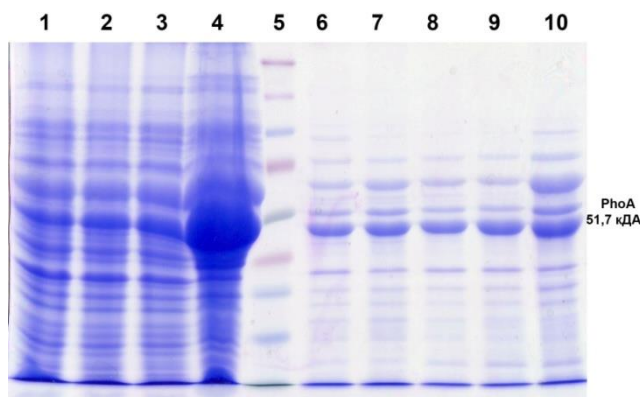
Из геномной ДНК бактерии *E. coli* был амплифицирован ген щелочной фосфатазы. ПЦР-амплификацию проводили с использованием олигонуклеотидов:

Phosph-fw (GGGAATTCATATGGTGAACAAAGCACTATTG) и Phosph-rv (CGCGGATCCGTTATTTTCAGCCCCAGGGCGG).

Амплификацию гена проводили методом полимеразной цепной реакции. Далее, ПЦР-продукт обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NdeI и BamHI в буфере 2XTango для образования липких концов. Параллельно, рестриктазами обрабатывали вектор pET-28c(+). Полученные фрагменты ДНК подвергали очистке

сорбенты, содержащие ионы двухвалентных металлов имеющие высокую аффинность к гистидину.

Компетентные клетки бактерий *E.coli* штамма ArcticExpress (DE3) трансформированы полученным плазмидным вектором pPhoA и, в результате, получен генно-инженерный штамм-продуцент рекомбинантной щелочной фосфатазы. Трансформацию клеток проводили методом электропорации с использованием электропоратора MicroPulser (BioRad). Отбор клонов-трансформантов проводили на агаризованной ЛБ-среде с канамицином в концентрации 50 мкг/мл. После 16 часовой инкубации трансформированной культуры в суховоздушном термостате при температуре +37°C наблюдался устойчивый рост колоний. Одну колонию инокулировали в 5 мл ЛБ-бульона с добавлением канамицина и растили при +37°C и встряхивании 200 об/мин в течение 16 часов. Далее, культуру вносили в 200 мл свежей ЛБ-среды с канамицином и растили до достижения оптической плотности OD₆₀₀=0,6. После чего отбирался образец культуры для контроля, а культуру индуцировали с помощью ИПТГ в концентрации 0,5 мМ. Индуцированную культуру инкубировали при +30°C, встряхивании 150 об/мин в течение 16 часов с отбором проб через 3, 4, 5, 6 и 16 часов. Клетки образцов осаждали центрифугированием (6000g, +4°C, 7 мин.) и лизировали ультразвуковым соникированием. Лизат разделяли центрифугированием (13200g, +4°C, 30 мин.) на надосадочную жидкость и осадок и анализировали белковым электрофорезом. На рисунке 2 представлены результаты анализа.



1-4 –полные лизаты; 6-10 – надосадочная жидкость; 1,6 – 3 часа индукции; 2,7 – 4 часа индукции; 3,8 – 5 часов индукции; 9 – 6 часов индукции; 4,10 – 16 часов индукции;
5 – белковый маркер

Рисунок 2 – Результаты проверки экспрессии гена *phoA*

Как видно из рисунка 2, после 16 часов индукции наблюдается внутриклеточное накопление белка, соответствующего рекомбинантной щелочной фосфатазе PhoA с расчетной молекулярной массой 51,7 кДа.

В большем количестве данный белок присутствует после 16 индукции, что свидетельствует об отсутствии деградации рекомбинантного белка PhoA вследствие протеолиза. Культуру полученного штамма-продуцента ArcticExpress(DE3)/pPhoA растили до достижения OD₆₀₀=1,0, собирали центрифугированием (6000g, +4°C, 7 мин.). Собранные клетки с 10 мл культуры

суспендированы в 3 мл ЛБ-бульона с 50% глицерином и заложены на криосохранение при -80°C в качестве штамма-продуцента рекомбинантной щелочной фосфатазы PhoA.

Лизат индуцированной культуры штамма ArcticExpress(DE3)/pPhoA проверяли в нитрофенилфосфатном тесте на предмет проявления фосфатазной активности. Метод основан на образовании п-нитрофенола из п-нитрофенилфосфата. Образовавшийся п-нитрофенол дает желтое окрашивание с максимумом поглощения при 405 нм. В качестве отрицательного контроля использовали бактериальный лизат штамма ArcticExpress(DE3). В результате установлено, что лизат индуцированной культуры штамма ArcticExpress(DE3)/pPhoA однозначно проявляет фосфатазную активность характерную для целевого фермента.

Полученные результаты позволяют сформулировать следующие выводы: создана генно-инженерная конструкция, несущая ген щелочной фосфатазы PhoA из *Escherichia coli* под контролем T7 промотора. Нароботан плазмидный вектор pProA в количестве 50 мкл с концентрацией 86 нг/мкл; получен генно-инженерный штамм-продуцент ArcticExpress (DE3)/pPhoA рекомбинантной щелочной фосфатазы PhoA. Практическая значимость данной работы заключается в том, что щелочная фосфатаза может быть использована в генной инженерии для дефосфорилирования 5'-концов нуклеиновых кислот, в молекулярной биологии и диагностике.

Список литературы

1. Lequin, R. M. Enzyme Immunoassay (EIA) /Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) // Clinical Chemistry. – 2005. – Vol. 51. – P. 2415–8.
2. Schmidt, SD, Mazzella, MJ, Nixon, RA, Mathews, PM. A β measurement by enzyme-linked immunosorbent assay // Methods in Molecular Biology. – 2012. – Vol. 849. – P. 507–27.
3. Kathleen M., Holtz., Evan R. Kantrowitz. The mechanism of the alkaline phosphatase reaction: insights from NMR, crystallography and site-specific mutagenesis // FEBS Letters. – 1999. – Vol.462. – P. 7-11.
4. Stephanopoulos, N.; Francis, M. B. Choosing an effective protein bioconjugation strategy // Nature Chemical Biology. – 2011. – Vol. 7 (12). – P. 876–884.
5. Kayzad S.N., Anuradha A., Amara S.R., Shree K.A. Cloning and Overexpression of Alkaline Phosphatase PhoK from *Sphingomonas* sp. Strain BSAR-1 for Bioprecipitation of Uranium from Alkaline Solutions // Applied and environmental microbiology. – 2008. – P. 5516–5523.
6. Maniatis T., Fritsch E.E., Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. – 545 p.