



УДК 576.315.42

© 1994 К. И. Иванов, П. А. Иванов*,
Е. К. Тимофеева**, В. А. Ефимов*, Ю. Л. Дорохов

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ ТРАНСПОРТНЫХ БЕЛКОВ ДВУХ ШТАММОВ
ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ И ИХ ЭКСПРЕССИЯ
В КЛЕТКАХ *Escherichia coli*

*Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова;*

** Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва;*

*** Кафедра вирусологии биологического факультета Московского
государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Ключевые слова: белки транспортные, вирус табачной мозаики, хроматография никель-хелатная.

Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и последующим клонированием в вектор рQE-9 получены рекомбинантные плазмиды, содержащие гены транспортных белков вируса табачной мозаики (ВТМ) *vulgare* и штамма ВТМ, способного инфицировать растения семейства крестоцветных (ВТМ-кр). Трансформацией рекомбинантных плазмид в клетки *E. coli* получены бактериальные штаммы-продуценты вирусных транспортных белков, содержащих на N-конце шесть гистидиновых остатков (His)₆. Проведена хроматографическая очистка рекомбинантных (His)₆-белков от белков *E. coli* на никель-хелатном сорбенте.

Тобамовирусы — это группа палочковидных растительных вирусов, геном которых состоит из одонитевой смысловой РНК длиной около 6400 нуклеотидов. Геномная РНК вируса табачной мозаики (ВТМ), типового представителя этой группы, кодирует белки с молекулярной массой 183, 126, 30 и 17 кДа [1—4]. Первые два белка, принимающие участие в репликации вирусной РНК, транслируются непосредственно с геномной вирусной РНК [5, 6]. 17 кДа-белок является капсидным белком, входящим в состав вириона. С каждым годом увеличивается число доказательств того, что 30 кДа-белок выполняет транспортную функцию, т. е. обеспечивает распространение вирусной инфекции из клетки в клетку [7—11].

Адрес для переписки: 119899, Москва, Ленинские горы, МГУ, Институт физико-химической биологии, Ю. Л. Дорохову.

Изучение транспортного белка ВТМ *in vitro* осложнялось тем фактом, что в инфицированных тканях листа он накапливается в чрезвычайно малых количествах. Использование генно-инженерных методов позволило недавно получить штамм *E. coli* — продуцент 30 кДа-белка ВТМ *vulgare* [12]. Последующая очистка выделенного в сравнительно больших количествах белка от белков *E. coli* дала возможность начать исследования его биохимических свойств *in vitro*.

Ранее [13] нами была определена нуклеотидная последовательность 3'-концевого участка генома штамма ВТМ, инфицирующего помимо табака растения семейства крестоцветных (ВТМ-кр). Эта последовательность включает в себя гены, кодирующие транспортный (30 кДа) и капсидный белки, а также 3'-концевой нетранслируемый участок. Оказалось, что по ряду параметров геном этого штамма существенно отличается от ВТМ *vulgare*. Так, в 3'-концевой нетранслируемой области выявлена структурная дупликация участка псевдоузлов. Ген белка оболочки ВТМ-кр оказался существенно короче, чем у других штаммов этого вируса. Сравнительный анализ аминокислотной последовательности транспортного белка ВТМ-кр свидетельствует о существенных различиях этого белка и аналогичных белков из других штаммов ВТМ [13].

В настоящей работе описывается получение новых бактерий-продуцентов транспортных белков ВТМ-кр и ВТМ *vulgare*, а также очистка этих белков на аффинных колонках.

Для создания штаммов *E. coli* — продуцентов вирусных транспортных белков была выбрана система QIAexpress, разработанная фирмой QIAGEN, которая позволяет получить высокий уровень экспрессии клонированных генов и проводить одноступенчатую хроматографическую очистку рекомбинантных белков от белков *E. coli*. Такая очистка становится возможной благодаря наличию дополнительной короткой последовательности из шести остатков гистидина (His)₆ на N- или C-конце рекомбинантного белка. В системе QIAexpress используется семейство плазмидных векторов pQE для экспрессии рекомбинантных белков с гексагистидиновыми концевыми фрагментами [14]. Все векторы семейства pQE обладают сильными модифицированными промоторами фага T5, содержащими два *lac*-операторных локуса. Регуляция промотора в векторах pQE осуществляется под контролем *lac*-репрессора, который кодируется на отдельной мультикопийной плазмиде pREP-4 и поэтому присутствует в клетке в постоянном избытке. Наличие синтетического участка связывания рибосом (RBS II) в векторах семейства pQE обеспечивает оптимальное протекание процесса инициации трансляции.

Для одноступенчатой очистки белков с (His)₆-концевыми фрагментами был разработан быстрый и удобный хроматографический метод, который основывается на использовании никель-хелатного сорбента, селективно связывающего шесть остатков гистидина рекомбинантного белка [15]. Связывание происходит за счет того, что имидазольные кольца соседних гистидинов занимают два свободных координационных места в комплексе никеля с иммобилизованным комплексоном I (нитрилтриацетатом или НТА). Интересно, что связывание (His)₆-белка с Ni-НТА-сорбентом осуществляется только в щелочной области pH, когда имидазольные кольца гистидинов депротонированы. При понижении pH комплекс разрушается и рекомбинантный белок элюируется с колонки. Таким образом, становится возможным, предварительно смыв при высоких pH не связавшиеся с сорбентом белки *E. coli*, после понижения pH отдельно собрать целевой белок. Реакция комплексообразования протекает как в физиологических буферах, так и в 6 М гуанидингидрохлориде, что дает возможность производить очистку практически нерастворимых в воде белковых тел включения.

Первым этапом данной работы было получение бактериального штамма-продуцента транспортного белка ВТМ *vulgare* по схеме, описываемой ниже.

Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) был получен фрагмент ДНК, соответствующий гену, кодирующему 30 кДа-белок ВТМ *vulgare*. Для удобства проведения транскрипции *in vitro* и трансляции в бесклеточной белоксинтези-

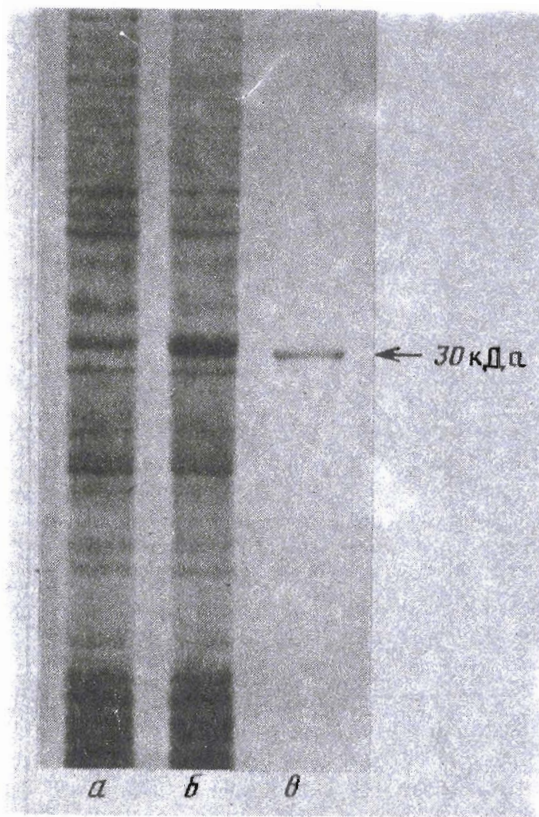


Рис. 1. Анализ лизата клеток, содержащих плазмиду рQE-9 с клонированным геном 30 кДа-белка ВТМ, в денатурирующем ПААГ по Лэммли до (а) и после (б) индукции IPTG. Очищенный транспортный белок ВТМ *vulgare* после аффинной хроматографии клеточных лизатов на Ni-НТА-агарозе (в)

рующей системе из ретикулоцитов кролика (результаты не показаны) амплифицированные фрагменты ДНК были клонированы в фагмидный вектор рBLUESCRIPT SK⁺ по *EcoRI/SmaI*-сайтам. Далее нам было необходимо получить эту же последовательность ДНК для клонирования в вектор рQE-9 по сайтам *BamHI/PstI*. Для этого была проведена ПЦР, в которой в качестве матрицы использовалась линейная ДНК рBLUESCRIPT SK⁺/P30, а затравками служили олигонуклеотиды, содержавшие сайты *BamHI* и *PstI*. Затравка с сайтом *BamHI*, соответствующая началу гена, содержала также кодоны аспарагина и глицина, которые были введены с целью получения участка расщепления гидроксиламином в рекомбинантном белке для освобождения от (His)₆-концевого фрагмента. Амплифицированные фрагменты ДНК были вырезаны из геля и обработаны рестриктазами *BamHI* и *PstI* для последующего клонирования в вектор рQE-9. Полученными рекомбинантными плазмидами трансформировали клетки *E. coli* штамма M15 [14]. Отобранные клоны выращивали в небольших объемах культуральной среды, а затем индуцировали экспрессию клонированного гена при помощи изопропил-β-D-тиогаалактозида (IPTG). Полученные клеточные лизаты анализировали электрофорезом в 12% ПААГ, содержащем SDS, по методу Лэммли [16], причем в качестве негативного контроля использовались лизаты клеток, отобранных до прибавления IPTG. В результате в ряде клонов удалось идентифицировать белковые полосы, соответствующие по подвижности транспортному белку ВТМ *vulgare* с молекулярной массой 30 кДа (рис. 1, дорожка б).

Никель-хелатная хроматография полученных клеточных лизатов позволила

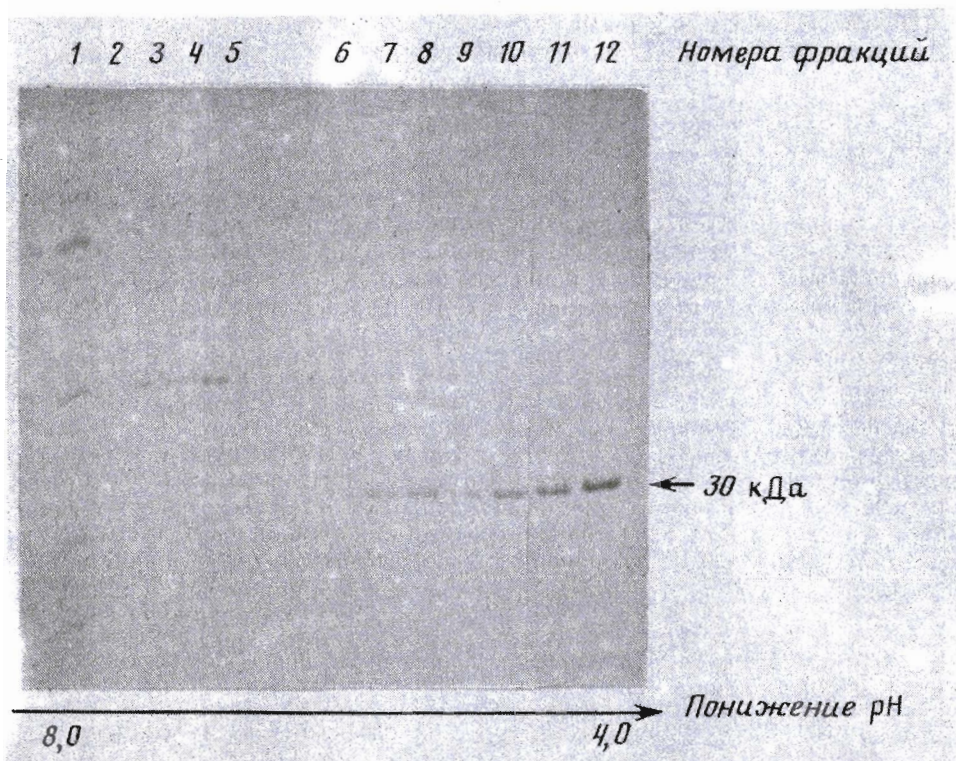


Рис. 2. Электрофоретический анализ результатов хроматографической очистки транспортного 30 кДа-белка ВТМ *vulgare* на Ni-НТА-агарозе. Фракции 1—5 содержат белки *E. coli*, элюированные при высоких рН, а фракции 6—12 — очищенный рекомбинантный белок

добиться удовлетворительной очистки целевого белка от белков *E. coli* (рис. 1, в). Как видно из рис. 2, белки *E. coli* выходят с колонки при высоких рН (фракции 1—5), а рекомбинантный белок элюируется отдельно в значительно более кислой среде (фракции 6—12).

Однако однократная хроматографическая очистка оказалась недостаточной для получения полностью гомогенного 30 кДа-белка, так как электрофорез избыточного количества белкового материала и седиментационный анализ показали присутствие дополнительных коротких пептидов. Поэтому нами была проведена повторная хроматография 30 кДа-белка на Ni-НТА-агарозе. Чистоту элюированного с колонки белка контролировали электрофорезом в денатурирующем ПААГ в режиме перезгрузки геля. Окрашивание геля кумасси обнаружило присутствие только одной белковой полосы (результаты не показаны).

На втором этапе работы по описанной выше схеме получали бактерии-продуценты транспортного белка ВТМ-кр. Фрагмент ДНК, соответствующий транспортному гену ВТМ-кр, был получен методом ПЦР с использованием затравок, содержащих сайты рестрикции *Bam*HI и *Hind*III. Продукты амплификации клонировали в вектор pQE-9 по сайтам *Bam*HI/*Hind*III. После отбора рекомбинантных клонов в них индуцировали экспрессию транспортного гена ВТМ-кр при помощи IPTG. Далее клеточные лизаты подвергали хроматографической очистке на Ni-НТА-агарозе.

Очищенный транспортный белок ВТМ-кр анализировали в денатурирующем ПААГ по Лэммли в сравнении с 30 кДа-белком ВТМ *vulgare*. Из рис. 3 видно, что подвижность транспортного белка ВТМ-кр больше подвижности 30 кДа-белка

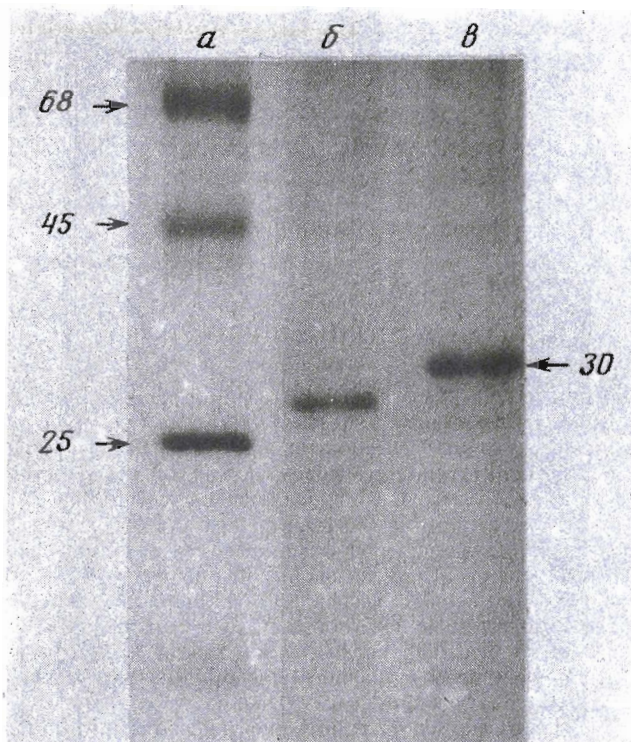


Рис. 3. Электрофорез в 12% ПААГ, содержащем SDS, очищенных на аффинной колонке с Ni-ИГТА-агарозой транспортных белков ВТМ-кр (б) и ВТМ *vulgare* (в); а — маркерные белки. Приведены молекулярные массы белков в килодальтонах

ВТМ *vulgare* и совпадает с подвижностью белка, полученного при трансляции РНК ВТМ-кр в бесклеточной белоксинтезирующей системе из ретикулоцитов кролика (результаты не показаны).

Таким образом, нам удалось получить бактериальные штаммы-продуценты транспортных белков ВТМ *vulgare* и ВТМ-кр, а также добиться удовлетворительной очистки рекомбинантных (His)₆-белков от белков *E. coli*. Это открывает перспективу сравнительного физико-химического анализа транспортных белков тобамовирусов.

Экспериментальная часть

В работе использовались ферменты: эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI, *Hind*III (20—30 ед. акт./мкл, «Бион», Новосибирск), *Pst*I (30 ед. акт./мкл, «Биопол», Москва); ДНК-полимераза *Thermus aquaticus*, *Taq* (5 ед. акт./мкл, «Бион», Новосибирск); ДНК-лигаза фага Т4 (4 ед. акт./мкл, «Ферментас», Вильнюс). Использовались также Ni-нитрилтриацетатная (Ni-НТА) агароза, QIAEX-смола (DIAGEN/QIAGEN, Германия/США); акриламид (Fluka, Швейцария); N,N'-метиленбисакриламид, трис, агароза, канамицин (Sigma, США); EDTA (Serva, Германия); изопропил-β-D-тиогалактозид (IPTG), ампициллин («Биопол», Москва); MgCl₂ (Merck, Германия); агар, бакто-триптон, дрожжевой экстракт (Difco, США).

Дезоксирибоолигонуклеотидные затравки были синтезированы на ДНК-синтезаторе фирмы Applied Biosystems, модель 380 В.

Штамм клеток *E. coli* M15[pREP4] (*Nal*^s *Str*^s *rif*^s, *lac*⁻ *ara*⁻ *gal*⁻ *mtl*⁻ F⁻

recA⁺ uvr⁺) и плазида рQE-9 любезно предоставлены проф. Е. Маиссом (Институт биохимии вирусов растений, Брауншвейг, Германия).

Полимеразная цепная реакция. 100 мкл реакционной смеси включали в себя: 10 мкл 10X-буфера (670 мМ трис-НСl, рН 8,9; 166 мМ сульфат аммония; 100 мМ β-меркаптоэтанол; 6,7 мМ MgCl₂), 10 мкл 12,5 мМ dNTP, 10 мкл 1% желатина, по 15 пмоль каждой затравки, 1 мкл амплифицируемой ДНК (1 мкг), 10 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы. Реакцию проводили на приборе Perkin — Elmer Cetus в следующем режиме (время, мин/т, °С): 1-й цикл — 10/94, 4/58, 5/72; 2 — 49-й циклы — 1/94, 1/58, 3/72; 50-й цикл — 2/94, 4/58, 10/72, 5/58. По окончании реакции отбирали 10 мкл пробы и проводили электрофорез в 1% агарозе.

Очистка ПЦР-фрагментов электрофорезом через агарозный гель. Для удаления масла проводили экстракцию хлороформом (1,5—2 объема к объему образца). После этого ДНК осаждали 3 объемами этанола и 0,5 объема 7,5 М ацетата аммония (20 мин при —70°С, центрифугирование 10 мин, 14 000 об/мин). Осадок промывали 1—2 раза 80% этанолом. Подобную процедуру осаждения ДНК использовали в дальнейшей работе.

Переосажденные продукты амплификации подвергали препаративной очистке электрофорезом через 1% агарозный гель. Таким образом удаляли возможные загрязнения: остатки праймеров и мелкие фрагменты ДНК.

Выделение ДНК из агарозы производили как по классической схеме электропереноса на нитроцеллюлозу NA45 согласно рекомендациям фирмы Schleicher and Schuell, так и с использованием нового метода, предложенного фирмой QIAGEN. В соответствии с этим методом ПЦР-фрагменты вырезали из геля под ультрафиолетом, растворяли агарозу в буфере QX1 (3 М NaI, 4 М NaClO₄, 0,1% Na₂S₂O₃, 10 мМ трис-НСl, рН 7,0) и осаждали ДНК из раствора в комплексе с Qiaex-смолой.

Клонирование и экспрессия генов транспортных белков *BTM vulgare* и *BTM-кр* в плазмидном векторе рQE-9. Гены клонировали в плазмидном векторе рQE-9 по липким концам с использованием сайтов *Bam*HI/*Pst*I и *Bam*HI/*Hind*III в полилинкере вектора. Лигирование проводили, как описано Маниатисом и др. [17]. Лигазную смесь трансформировали в клетки *E. coli* штамма M15[рREP4], как описано Ханаханом [18]. Отбор экспрессирующих клонов производили путем сравнения роста колоний, выращенных на чашках Петри с IPTG и без индуктора. Плохой рост колоний на чашках с IPTG свидетельствовал об экспрессии в них клонированных генов, продукты транскрипции которых токсичны по отношению к *E. coli*. Отобранные таким образом клоны выращивали в небольшом объеме (5 мл) культуральной среды (2хУТ или LB), содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл канамицина, при 37°С до оптического поглощения 0,8—0,9 (λ 600 нм). Затем часть объема отбирали в качестве отрицательного контроля, а к оставшемуся объему добавляли 10 мкл 1 М IPTG и инкубировали дополнительно в течение 3—5 ч. Клетки отделяли от культуральной среды центрифугированием (5 мин, 5000 об/мин), лизировали их кипячением (10 мин, 95°С) и клеточные лизаты анализировали на наличие рекомбинантных белков по Лэммли до и после добавления IPTG. Клоны, в которых удалось идентифицировать белковые полосы, соответствующие по подвижности 30 кДа, далее выращивали в больших объемах 2хУТ-бульона (20—100 мл) до оптического поглощения 0,8—0,9 (λ 600 нм) и индуцировали в них экспрессию клонированных генов с помощью IPTG. Бактериальные клетки лизировали, а затем проводили хроматографическую очистку рекомбинантных белков на колонках с Ni-НТА-агарозой.

Хроматографическая очистка транспортных белков с гексагистидиновыми концевыми фрагментами на Ni-НТА-агарозе. После индукции IPTG клетки осаждали центрифугированием (4000г, 10 мин при 4°С) и ресуспендировали в лизис-буфере А (буфер А: 6 М гуанидингидрохлорид, 0,1 М NaH₂PO₄, 0,01 М трис, рН 8,0) в расчете 5 мл буфера А на 1 г клеток *E. coli*. Клетки оставляли

при 20° С на 1 ч. Клеточные лизаты центрифугировали (10 000 об/мин, 15 мин) и наносили супернатант на предварительно уравновешенную буфером А колонку с Ni-НТА-агарозой (1,6×8,5 см, v 17 мл). Далее колонку промывали последовательно (по ~100 мл) буфером В (8 М мочевины, 0,1 М NaH₂PO₄, 0,01 М трис, рН 8,0), затем буфером С (аналогичного состава, рН 6,3), буфером D (аналогичного состава, рН 5,9) и буфером Е (аналогичного состава, рН 4,0), собирая фракции по 2 мл. Белковые продукты в элюатах регистрировали с помощью проточного спектрофотометра Uvicord 8300 фирмы LKB. Белковый состав полученных фракций анализировали на денатурирующем ПААГ по Лэммли.

Авторы выражают благодарность сотруднику Института молекулярной биологии РАН Б. К. Чернову за синтез олигонуклеотидных праймеров.

Работа частично финансировалась Российским фондом фундаментальных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beachy R. N., Zaitlin M., Bruening G., Israel H. W.//Virology. 1976. V. 73. P. 498—507.
2. Bruening G., Beachy R. N., Scalla R., Zaitlin M.//Virology. 1976. V. 71. P. 498—517.
3. Goelet P., Karn J.//J. Mol. Biol. 1982. V. 154. P. 541—550.
4. Goelet P., Lomonosoff G. P., Butler P. J. G., Akam M. E., Gait M. J., Karn J.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. P. 5818—5822.
5. Pelham H. R. B.//Nature. 1978. V. 272. P. 469—471.
6. Palukaitis P., Zaitlin M.//Plant Viruses. V. 2/Eds M. H. V. Regenmortel van, H. Fraenkel-Conrat. N. Y.: Plenum Press, 1986. P. 105—131.
7. Atabekov J. G., Dorokhov Yu. L.//Adv. Virus Res. 1984. V. 29. P. 313—364.
8. Hull R.//Ann. Rev. Phytopathol. 1989. V. 27. P. 213—240.
9. Meshi T., Watanabe Y., Saito T., Sugimoto A., Maeda T., Okada Y.//EMBO J. 1987. V. 6. P. 2557—2563.
10. Zimmern D., Hunter T.//EMBO J. 1983. V. 2. P. 1893—1900.
11. Deom C. M., Cliver M. J., Beachy R. N.//Science. 1987. V. 237. P. 389—394.
12. Citovsky V., Knorr D., Schuster G., Zambrysky P.//Cell. 1990. V. 60. P. 637—647.
13. Дорохов Ю. Л., Иванов П. А., Повиков В. К., Ефимов В. А., Атабеков И. Г.//Докл. РАН. 1993. Т. 332. С. 518—522.
14. Henco K.//QIAXpressionist. Düsseldorf: DIAGEN, 1991.
15. Hochuli E., Döbeli H., Schacher A.//J. Chromatogr. 1987. V. 411. P. 177—184.
16. Laemmli U.//Nature. 1970. V. 227. P. 680—685.
17. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
18. Ханнахан Д.//Клонирование ДНК. Методы/Ред. Д. Гловер. М.: Мир, 1988. С. 154, 155.

Поступила в редакцию
30.IX.1993

После доработки
15.XI.1993

K. I. Ivanov, P. A. Ivanov, E. K. Timofeeva**,
V. A. Efimov*, Yu. L. Dorokhov*

**CLONING OF THE MOVEMENT PROTEIN GENES OF TWO STRAINS
OF TOBACCO MOSAIC VIRUS AND THEIR EXPRESSION
IN *Escherichia coli* CELLS**

*A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow;*

** M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow;*

*** Department of Virology, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

Key words: movement proteins, tobacco mosaic virus, immobilized metal affinity chromatography.

Recombinant constructs expressing fusion (His)₆ movement proteins of two strains (Cruciferous and Vulgare) of tobacco mosaic virus were generated by cloning the PCR-amplified fragments into the pQE-9 vector. The movement proteins containing N-terminal (His)₆ affinity tags were purified on a metal chelate adsorbent.