



УДК 577.218

## РЕКОМБИНАНТНАЯ His<sub>6</sub>-ДНК-ПОЛИМЕРАЗА *Thermus thermophilus* С АКТИВНОСТЬЮ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ

© 1997 г. Ю. В. Смирнов<sup>#</sup>, О. Г. Чахмахчева, В. А. ЕфимовИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 27.06.96 г. Принята к печати 03.12.96 г.

Клонирован ген *Tth*-полимеразы из термофильной бактерии *Thermus thermophilus* штаммов НВ-8 и Тt-111. Осуществлена его экспрессия в *E. coli* в виде гибрида с полигистидиновым доменом в N-концевой части белка. Препарат рекомбинантного фермента выделен за одну стадию с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе. Показано, что His<sub>6</sub>-*Tth*-полимераза обладает высокой активностью ДНК-полимеразы и обратной транскриптазы.

*Ключевые слова:* *Tth*-полимераза, RT-PCR, хроматография металл-хелатная.

Ранее было показано, что рекомбинантная ДНК-полимераза термофильной эубактерии *Thermus thermophilus* (*Tth*-полимераза) обладает ревертазной активностью, которая во много раз превышает аналогичную активность ДНК-полимеразы из *Th. aquaticus* (*Taq*-полимераза) [1]. Хотя первоначально было обнаружено, что при использовании *Tth*-полимеразы значительное количество кДНК синтезируется в виде укороченных молекул, авторам [1] удалось подобрать условия (наличие иона Mn<sup>2+</sup> в буфере для инкубации и молярное соотношение фермента и матрицы, близкое к 1), при которых достигается полноразмерность кДНК. Эти же авторы проводили реакцию обратной транскрипции в сочетании с ПЦР для амплификации образовавшихся кДНК (RT-PCR), используя рекомбинантную *Tth*-полимеразу. Так, исходя из 400 пг суммарной РНК и двух праймеров DM151/DM152, методом RT-PCR была получена кДНК для мРНК интерлейкина 1 $\alpha$ , причем слабый сигнал на агарозном геле-электрофорезе наблюдали уже при введении в реакцию 80 пг суммарной РНК, что эквивалентно примерно 10 клеткам [1]. При этом авторы полагали, что применение *Tth*-полимеразы для обратной транскрипции молекул мРНК при температуре около 70°C облегчает эффективное считывание участков с устойчивой вторичной структурой, затрудненное или даже невозможное в случае вирусных обратных транскриптаз, обычно применяемых при 37–42°C.

Сокращения: Ni-NTA-агароза – сорбент с ионами Ni<sup>2+</sup>, координированными хелатирующими нитрилотриацетатными лигандами; IPTG – изопропил- $\beta$ -D-тиогактопиранозид; PMSF – фенолметилсульфонилфторид; HEPES – N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота.

<sup>#</sup> Автор для переписки.

В связи с необходимостью получения большого числа амплификационных библиотек кДНК из ограниченного количества биологического материала, а также в связи с дороговизной и зачастую недостаточным качеством коммерческих препаратов обратных транскриптаз (AMV и MMLV) нами были предприняты исследования по получению штамма *E. coli*, продуцирующего рекомбинантную His<sub>6</sub>-*Tth*-полимеразу аналогично тому, как это было описано нами ранее для рекомбинантной His<sub>6</sub>-*Taq*-полимеразы [2]. Мы предполагали, что изменение N-концевой части молекулы *Tth*-полимеразы, как и в случае His<sub>6</sub>-*Taq*-полимеразы, не затронет полимеразной и ревертазной активностей этого фермента, одновременно обеспечив быстрое получение гомогенного препарата рекомбинантного белка.

Известно, что первичные структуры генов *Taq*- и *Tth*-полимераз обладают 93% подобия и 88% идентичности [1]. Поэтому для выделения и амплификации генов ДНК-полимеразы из *Th. thermophilus* штаммов НВ-8 и Тt-111 в качестве праймеров были использованы олигонуклеотиды (1) и (4), примененные нами ранее при клонировании гена His<sub>6</sub>-*Taq*-полимеразы из *Th. aquaticus* штамма YТ-1 и имеющие сайты эндонуклеаз *Bgl*III и *Eco*RI для встраивания амплифицированного гена в экспрессирующий вектор [2] (рис. 1).

Амплификацию генов *Tth*-полимеразы вышеуказанных штаммов проводили с помощью рекомбинантной His<sub>6</sub>-*Taq*-полимеразы [2]. Продукты амплификации, соответствующие полноразмерным генам с длиной около 2500 п. о., обрабатывали рестриктазами *Bgl*III и *Eco*RI и встраивали с помощью ДНК-лигазы в предварительно расщепленную этими же ферментами плазмиду рТН-1 [5] (рис. 2). Необходимо отметить, что в последовательности праймера (4) рядом с сайтом *Eco*RI был

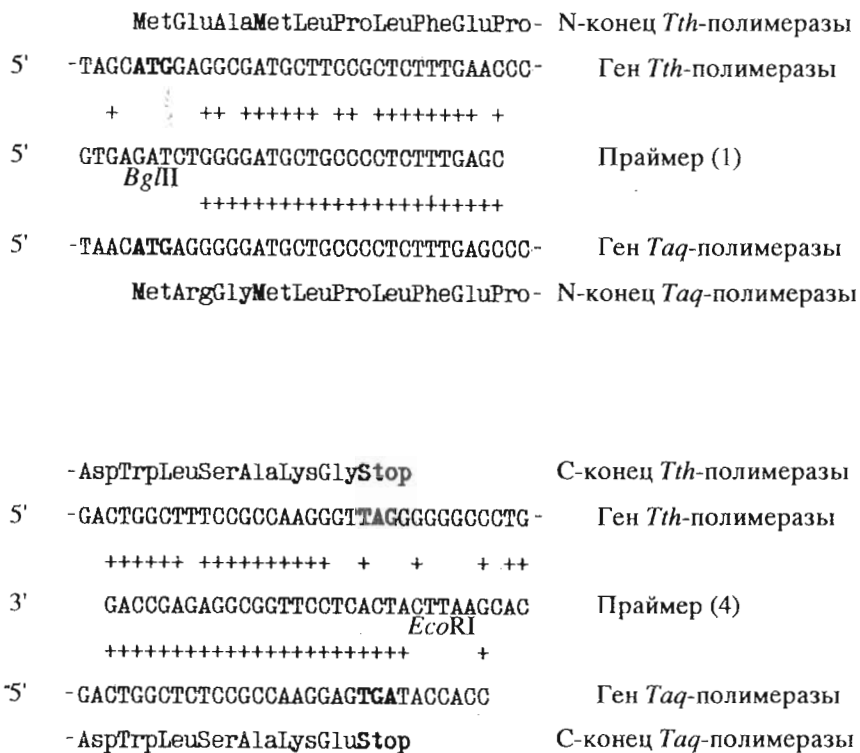


Рис. 1. Сравнение последовательностей праймеров (1) и (4) с 5'- и 3'-концевыми областями генов *Tth*- [3] и *Taq*-полимеразы [4] (плюсом отмечено совпадение нуклеотидов в праймерах и соответствующих частях генов при ПЦП).

5'

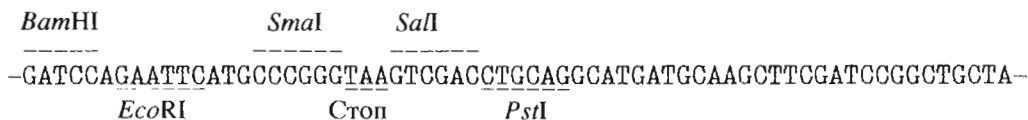
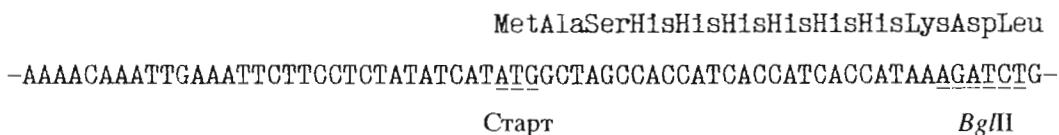
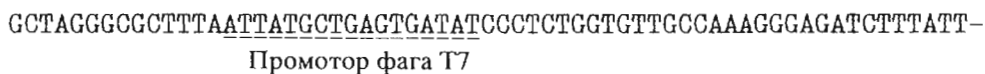


Рис. 2. Строение плазмиды рТН-1 вблизи места встраивания гена ДНК-полимеразы.

введен комплементарный терминирующему кодону триплет для точного сохранения С-концевой структуры белковой молекулы рекомбинантной ДНК-полимеразы. Как и в случае *His<sub>6</sub>-Taq*-полимеразы, полученная конструкция должна была обеспечить сохранение рамки считывания, а продукт ее экспрессии – содержать на N-конце 12 до-

полнительных аминокислотных остатков с кластером из 6 остатков гистидина, обеспечивающим очистку целевого рекомбинантного фермента с помощью металл-аффинной хроматографии [6].

После трансформации клеток *E. coli* штамма BL-21 (DE-3) плазмидами рТН-1-2 и рТН-1-4, содержащими гены *Tth*-полимеразы из штаммов

НВ-8 и Тt-111 соответственно, выросшие на чашках с ампициллином колонии проверяли на наличие активности ДНК-полимеразы при 75°C [3, 7]. Таким образом, было отобрано 11 клонов с геном из штамма НВ-8 и 8 клонов с геном из штамма Тt-111, лизаты которых обладали высокой ДНК-полимеразной активностью.

Отобранные клоны выращивали на LB-среде с ампициллином и IPTG и осветленные лизаты [8] тестировали на наличие ревертазной активности по методике [1].

В результате были отобраны клоны-производители с максимальной полимеразной и ревертазной активностью, несущие ген *Tth*-полимеразы (по одному из штаммов НВ-8 и Тt-111), которым были присвоены обозначения BL-21/pTH-1-2 и BL-21/pTH-1-4 соответственно.

Препаративное получение очищенного препарата рекомбинантного фермента с помощью аффинной хроматографии осветленных лизатов на колонке с Ni-NTA-агарозой было проведено по методике, описанной нами для очистки His<sub>6</sub>-*Taq*-полимеразы [2]. В таблице представлен баланс ДНК-полимеразной активности в процессе препаративной очистки фермента из биомассы *E. coli* BL-21/pTH-1-2, а на рис. 3 – электрофоретический анализ фракций в 8% полиакриламидном геле с SDS. Таким образом, с помощью аффинной хроматографии за одну стадию очистки достигнута практически полная гомогенность рекомбинантного фермента (при незначительном увеличении удельной активности). Аналогичный результат был получен и для BL-21/pTH-1-4.

Гомогенный препарат рекомбинантной His<sub>6</sub>-*Tth*-полимеразы, выделенный из биомассы *E. coli* с геном из штамма НВ-8, выращенной в объеме 100 мл среды LB, после концентрирования диализом против буфера для хранения [8] имел активность 5.7 ед/мкл при объеме 2.3 мл. Исходя из этого, можно рассчитывать на получение до 130000 ед. активности рекомбинантного фермента с 1 л среды. Очищенный препарат рекомбинантной His<sub>6</sub>-*Tth*-полимеразы, выделенный из биомассы *E. coli* с геном из штамма Тt-111, имевший несколько

ДНК-полимеразная активность фракций в процессе препаративной очистки His<sub>6</sub>-*Tth*-полимеразы из биомассы *E. coli* BL-21/pTH-1-2 аффинной хроматографией на Ni-NTA-агарозе

Фракция фермента	Активность, имп/(мин мкл)	Объем фракции, мл	Суммарная активность, 10 <sup>9</sup> имп/мин
Осветленный экстракт до колонки	144950	12.3	1.78
Объединенные "проскок" и промывка	15410	48.0	0.074
Объединенный элюат*	149700	10.5	1.57

\* После концентрирования диализом против буфера для хранения [8] было получено 2.3 мл фермента с активностью 5.7 ед. акт./мкл.

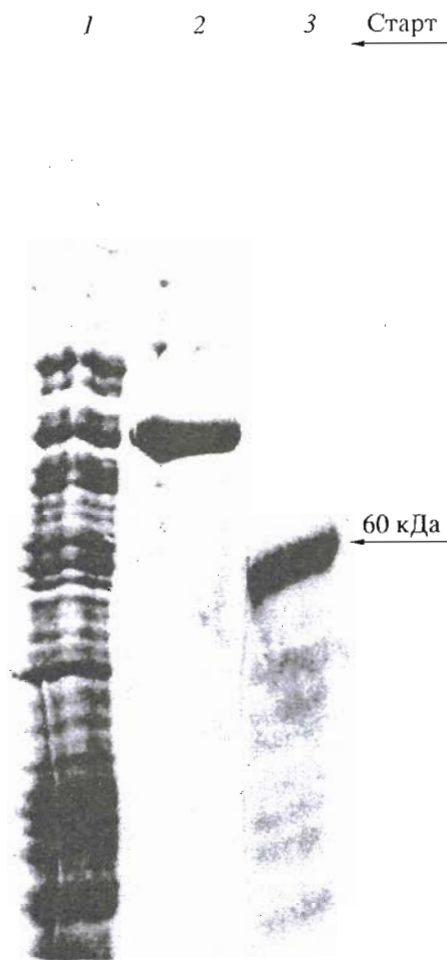


Рис. 3. Электрофоретический анализ в 8% полиакриламидном геле с SDS белковых фракций при очистке рекомбинантной His<sub>6</sub>-*Tth*-полимеразы из лизата клеток *E. coli* BL-21 (DE-3)/pTH-1-2 с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе: 1 – осветленный клеточный лизат до нанесения на колонку; 2 – фракция белков, связавшихся с Ni-NTA-агарозой, после элюции; обладает полимеразной и ревертазной активностями; 3 – молекулярный маркер (60 кДа).

меньшую полимеразную и ревертазную активность, в дальнейших опытах не использовали.

Амплификационные свойства очищенного препарата рекомбинантной His<sub>6</sub>-*Tth*-полимеразы

подтверждали синтезом с помощью ПЦР гена *Taq*-полимеразы с длиной 2500 п. о. и его фрагментов, применив соответствующие праймеры [2]. Следует отметить, что при хранении препаратов рекомбинантных  $\text{His}_6$ -ДНК-полимераз в течение нескольких месяцев мы наблюдали последовательное уменьшение способности ферментов к считыванию длинных матриц при ПЦР.

Анализ ревертазной активности очищенного препарата  $\text{His}_6$ -*Tth*-полимеразы проводили с использованием в качестве матрицы различных РНК и нагрузок фермента по методике работы [1]. В опыте с использованием в качестве матрицы 2 мкг ооцитарной poly(A+)-мРНК и 10 ед. ДНК-полимеразной активности фермента радиоактивность отделенного на сефадексе G-50 высокомолекулярного продукта превысила контроль почти в 100 раз (в контроле фермент заменили равным объемом воды). При использовании в качестве матрицы суммарной РНК, выделенной из 2 млн. клеток гибридомы E6/1.2, и 5 ед. акт. *Tth*-полимеразы радиоактивность синтезированного высокомолекулярного продукта превышала контроль в 80 раз, если РНК не обрабатывали предварительно ДНКазой I, и в 40 раз, если суммарную РНК предварительно очищали от возможных примесей ДНК обработкой ДНКазой I с последующей экстракцией фенолом и осаждением этанолом. Таким образом, полученный рекомбинантный фермент обладает заметной активностью обратной транскриптазы, что согласуется с данными вышеупомянутой работы [1].

В предварительном опыте по сравнению полученного препарата  $\text{His}_6$ -*Tth*-полимеразы с коммерческим препаратом обратной транскриптазы SuperScript<sup>TM</sup>II фирмы Gibco-BRL было обнаружено примерно одинаковое включение радиоактивной метки в кислотонерастворимый продукт при синтезе кДНК на различных матрицах РНК. При этом у  $\text{His}_6$ -*Tth*-полимеразы была обнаружена значительная ревертазная активность в отсутствие Т-праймера (данные не приведены).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали Ni-NTA-агарозу (QIAGEN, ФРГ); IPTG и oligo(dT)целлюлозу (Boehringer-Mannheim, Австрия); агарозу (Serva, ФРГ); ДНКазу I, свободную от РНКазы (Worthington, США); [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP с активностью 37 ПБк/моль (ИБХ РАН); HEPES и PMSF (Sigma, США); дитиотреит (Fluka, Швейцария); Tween-20 (Ferak, ФРГ); Nonidet NP-49 (Calbiochem, США); SuperScript<sup>TM</sup>II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase (Gibco-BRL, Великобритания).

Радиоактивность измеряли в толуольном сцинтилляторе на счетчике LS 9800 (Beckman, США).

**Выращивание биомассы термофильных бактерий *Th. thermophilus* штаммов NB-8 и Tt-111 и вы-**

**деление ДНК** из них проводили аналогично тому, как это было описано для штамма YТ-1 *Th. aquaticus* [3].

**Выделение суммарной РНК** из клеток мышечной гибридомы линии E6-1/2 [9], а также из ооцитов лягушки *Xenopus laevis* и из мозга мышцы проводили по методу [10] с двумя повторными фенольными обработками. Конечный препарат суммарной РНК очищали от предполагаемых примесей ДНК промывкой суспендированного спиртового осадка 3 М ацетатом Na, pH 5.2, либо обработкой ДНКазой, свободной от РНКазы [11], с последующей обработкой препаратов фенолом и осаждением спиртом.

**Poly(A+)-мРНК** получали пропусканием суммарной РНК из ооцитов лягушки через колонку с oligo(dT)-целлюлозой [11].

**Аmplификация полноразмерных генов *Tth*-полимеразы.** ПЦР осуществляли в процессе 30 циклов с денатурацией (1 мин при 94°C) и элонгацией (2 мин при 72°C) [8]. Смесь в объеме 100 мкл содержала 10 мМ трис-HCl (pH 8.3), 50 мМ KCl, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, dGTP, dATP, dCTP и TTP (100 мкМ каждый), 1 мкМ праймеры (1) и (4), 0.1–0.5 мкг ДНК штаммов NB-8 или Tt-111 и до 5 ед. акт.  $\text{His}_6$ -*Taq*-полимеразы. После 30-го цикла реакционную смесь выдерживали 7 мин при 72°C, затем охлаждали до 4°C. Размеры продуктов определяли гель-электрофорезом в 1% агарозном геле.

**Выращивание биомассы *E. coli* клонов VL-21/pTN-1-2 и VL-21/pTN-1-4, продуцирующих рекомбинантную *Tth*-полимеразу,** проводили в течение 18 ч при 37°C в объеме 100 мл или более среды LB [11] с добавлением 100 мкг/мл ампициллина и 1 мМ IPTG при интенсивном перемешивании, как описано в работе [8].

**Осветленные лизаты** выращенных клонов получали аналогично методике, опубликованной в работе [8].

**Очистка рекомбинантной *Tth*-полимеразы.** Все операции проводили при 5°C. Осветленный лизат клеток *E. coli* в объеме 12.3 мл наносили с помощью перистальтического насоса со скоростью 15 мл/ч на колонку (1.6 × 5 см) с 10 мл Ni-NTA-агарозы [6]. Сорбент был предварительно уравновешен 4 объемами буфера, содержащего 10 мМ трис-HCl (pH 7.9), 50 мМ KCl, 1 мМ PMSF и по 0.5% Tween-20 и Nonidet NP-40. После нанесения лизата колонку промывали 10 мл уравновешивающего буфера, затем несколькими объемами промывочного буфера, содержащего 20 мМ HEPES (pH 7.9), 100 мМ KCl, 0.5 мМ PMSF и 1 мМ дитиотреит.

$\text{His}_6$ -*Tth*-полимеразу элюировали тем же промывочным буфером с добавлением 0.6 М имидазола (pH 7.9). Фракции, содержащие ДНК-полимеразную активность, объединяли и раствор фермента концентрировали диализом против буфера для

хранения [8], содержащего 20 мМ HEPES (pH 7.9), 100 мМ KCl, 0.1 мМ EDTA, 0.5 мМ PMSF, 1 мМ дитиотреит и 50% глицерин. Фермент хранили несколько месяцев при -20°C без заметной потери активности.

**ДНК-полимеразную активность фермента** определяли в 50 мкл инкубационной смеси, содержащей 25 мМ трис-HCl (pH 9.5 при 22°C), 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ 2-меркаптоэтанол, по 10 нмоль dGTP, dCTP, TTP и [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dATP (40 МБк/мкмоль), 8 мкг активированной ДНК из тимуса теленка [7] и 2 мкл раствора фермента. Реакцию проводили при 75°C в течение 30 мин и останавливали добавлением 50 мкл 2% раствора пирогосфата натрия, содержащего 0.125 М EDTA. Инкубационную смесь переносили на кусочки бумаги Ватман 3ММ (1 × 2 см), высушивали и затем выдерживали 15 мин в 10% трихлоруксусной кислоте с 2% пирогосфатом натрия. Фильтры многократно промывали 5% трихлоруксусной кислотой с 2% пирогосфатом натрия, затем 95% этанолом, высушивали и определяли количество радиоактивной метки, включившейся в кислотонерастворимый продукт.

За 1 ед. акт. принимали количество фермента, синтезирующее 10 нмоль кислотонерастворимого продукта в этих условиях [3, 4, 7].

**Активности обратной транскриптазы** в препаратах ДНК-полимеразы определяли, взяв за основу методику из работы [1]. В качестве матрицы использовали суммарную РНК, выделенную из клеток гибридомы Е6-1/2 [10] и дополнительно очищенную от предполагаемых примесей ДНК, как указано выше, а также poly(A<sup>+</sup>)-мРНК, выделенную из суммарной РНК ооцитов лягушки [11]. В качестве праймера был использован олигонуклеотид (5') GGGAGGCCCTTTTТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТ (Т-праймер). Инкубационные смеси (50 мкл) содержали 10 мМ трис-HCl (pH 8.3), 90 мМ KCl, 1 мМ MnCl<sub>2</sub>, dGTP, dCTP, TTP и [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dATP (32 МБк/мкмоль) с концентрацией каждого 200 мкМ, 20 пмоль Т-праймера, суммарную РНК в количестве, выделенном из 2 млн. клеток гибридомы Е6/1.2 на каждую пробирку (или 2 мкг poly(A<sup>+</sup>)-мРНК из ооцитов лягушки), и 5–10 ед. ДНК-полимеразной

активности препаратов *Tth*-полимеразы. В контроле без фермента вместо него добавляли воду.

После инкубации при 72°C в течение 20 мин реакцию останавливали быстрым охлаждением во льду. Меченый высокомолекулярный продукт отделяли от невключившейся радиоактивности геле-хроматографией на колонках с сефадексом G-50 medium (16 × 0.6 см), уравновешенных буфером 10 мМ трис-HCl (pH 7.5) с 1 мМ EDTA, 0.1 М NaCl, 0.2% SDS, и отбором равных фракций по каплям. Фракции наносили на кусочки Ватмана 3ММ, промывали, высушивали и определяли радиоактивность высокомолекулярного продукта путем подсчета в сцинтилляторе.

Авторы выражают признательность А.Г. Зарайскому (ИБХ РАН) за предоставленные ооциты лягушки *Xenopus laevis* и Т.Ю. Мареевой (ИБХ РАН) за биомассу клеток линии Е6-1/2.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Myers T.W., Gelfand D.H. // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 7661–7666.
2. Смирнов Ю.В., Фрадков А.Ф., Чахмакчева О.Г., Ефимов В.А. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 396–398.
3. Asakura K., Komatsubara H., Soga S., Yomo T., Oka M., Emi S., Urabe I. // J. Ferment. Bioeng. 1993. V. 76. P. 265–269.
4. Lawyer F.G., Stoffel S., Saiki R.K., Myambo K., Drummond R., Gelfand D.H. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 6427–6437.
5. Ефимов В.А., Фрадков А.Ф., Калинин А.Л., Чахмакчева О.Г. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 11–17.
6. The QIAexpressionist // QUIAGEN. 1992. P. 12.
7. Каледин А.С., Слюсаренко А.Г., Городецкий С.И. // Биохимия. 1980. Т. 45. С. 644–651.
8. Engelke D.R., Krikos A., Bruck M.E., Ginsburg D. // Anal. Biochem. 1990. V. 191. P. 396–400.
9. Мареева Т.Ю., Котова О.В., Макаров Е.А., Андропова Т.М., Несмеянов В.А. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 551–561.
10. Chomczynski P., Sacchi N. // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 156–160.
11. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. P. 7.7–7.9.

## Recombinant His<sub>6</sub>-Tagged DNA Polymerase from *Thermus thermophilus* with the Reverse Transcriptase Activity

Yu. V. Smirnov, O. G. Chakhmakhcheva, and V. A. Efimov

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Mikhlukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

Abstract—The *Tth* DNA polymerase genes from the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* (strains HB-8 and Tt-111) were cloned and expressed in *Escherichia coli* cells. The target protein contained a polyhistidine tag at the N-terminus that allowed its single-stage isolation by affinity chromatography on Ni-NTA-agarose. The isolated enzyme displayed both high DNA polymerase and reverse transcriptase activities.

Key words: *Tth* DNA polymerase, RT-PCR, metal-chelating chromatography.