



УДК 577.112.083

Разработка методов эффективной суперпродукции и очистки фактора транскрипции ExuR из *Escherichia coli* с использованием аффинной хроматографии

Потапова А.В.^{1,2}, Озолинь О.Н.^{1,2}, Тутукина М.Н.^{1,2}¹ФГБУН «Институт биофизики клетки Российской академии наук», Пуцино, Московская область²ФГБОУ ВПО «Пуцинский государственный естественно-научный институт», Пуцино, Московская область

Поступила в редакцию 18.04.2014 г.

Аннотация

Разработан метод выделения и очистки рекомбинантного белка ExuR *Escherichia coli*. Метод включает клонирование гена *exuR* в вектор pGEMEX1, последующую суперпродукцию белка в штамме BL21*(DE3) *E. coli*, получение белка в растворимой фракции и несколько последовательных циклов аффинной хроматографии на колонке с Ni-NTA агарозой, заряженной сульфатом никеля. Данный метод позволяет получить электрофоретически гомогенный и функционально активный белок ExuR для дальнейших исследований.

Ключевые слова: аффинная хроматография, клонирование, факторы транскрипции, ExuR, *E. coli*.

A method for isolation and purification of the recombinant ExuR protein from *Escherichia coli* was developed. Process includes cloning of the *exuR* gene into pGEMEX1 vector, followed by overproduction of soluble protein in BL21 *(DE3) *E. coli* cells and a series of affine chromatography cycles on a column with Ni-NTA agarose charged with nickel sulfate. This approach allows obtaining of electrophoretically homogenous and functionally active ExuR protein for further investigation.

Keywords: affine chromatography, cloning, transcription factors, ExuR, *E. coli*

Введение

Факторы транскрипции - белки, осуществляющие регуляцию генной экспрессии на стадии синтеза РНК - составляют около 6% бактериального протеома. Молекулярные механизмы их действия чрезвычайно разнообразны, но в большинстве случаев активация или репрессия транскрипции опосредована взаимодействием регуляторного белка со специфическим мотивом в промоторной области гена. По структуре ДНК-связывающего домена и, следовательно, по способу взаимодействия с ДНК, факторы транскрипции подразделяют на 4 больших класса и ряд семейств в зависимости от их доменной структуры и ряда биохимических свойств [1, 2]. В соответствии с этой классификацией, фактор транскрипции ExuR принадлежит к суперклассу белков, взаимодействующих с ДНК посредством относительно простого консервативного N-концевого модуля «спираль-поворот-спираль» (НТН, helix-turn-helix), и семейству GntR (GntR=GlucNaTe operon Repressor), особенностью которого является наличие второго, крайне варибельного

белка позволило нам использовать аффинную хроматографию на Ni-NTA агарозе для его очистки и при этом не повлияло на ДНК-связывающие свойства EcuR, поскольку они обусловлены его N-концевым доменом.

Полученный вектор был назван pGEME_his. Он проверен на отсутствие мутаций прямым секвенированием и был использован для трансформации клеток BL21*(DE3), несущих ген РНК-полимеразы фага Т7. Клетки выращивали на среде LB Plates в присутствии ампициллина (100 мкг/мл) при 37°C, затем одиночные колонии пересевали на новые чашки с ампициллином для исключения контаминации и готовили ночную культуру. На следующий день бактерии переносили в 300 мл жидкой среды TB medium (рН 7.4) для наработки белка (конечное разведение ночной культуры 1:1000, рост при усиленной аэрации, 120 об/мин). Поскольку из литературных данных было известно, что регуляторы семейства GntR токсичны для клеток и плохо поддаются наработке в препаративных количествах [11, 12], стандартный протокол индукции был оптимизирован. Для этого нами была проведена серия экспериментов по дифференциальной индукции синтеза EcuR с использованием различных концентраций IPTG (от 0.01mM до 1mM) и времени предшествующего и последующего роста (см. рис.2).

Максимальный выход растворимого белка был получен после индукции рекомбинантного гена при $OD_{600}=0.5$ (логарифмическая фаза роста клеток) IPTG в низкой концентрации (0,02mM), после добавления которого клетки растили ещё 4-5 часов при 37°C. Клетки осаждали центрифугированием при 10000g (+4°C), осадок промывали холодным буфером Tris-EDTA (10mM Tris-HCl, рН 8.0, 1mM EDTA) и хранили при -20°C. Уровень экспрессии белка EcuR в клетках оценивался с помощью денатурирующего 12.5% ПААГ по модифицированному методу Дэвиса [13].

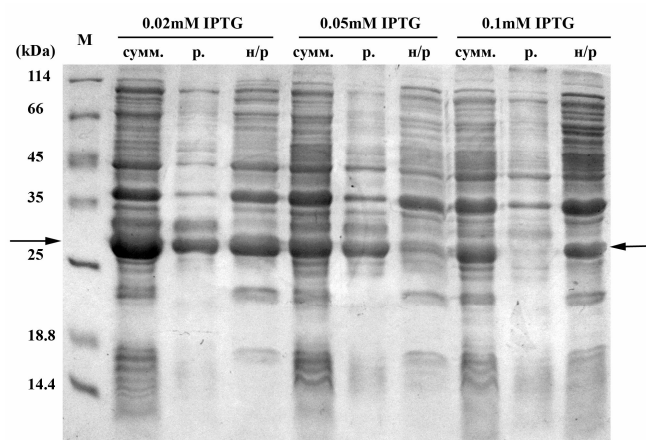


Рис. 2. Оптимизация режима индукции рекомбинантного гена *ecuR*.

Стрелками показано положение рекомбинантного *ecuR* ($M_w=29,8$ кДа).

«Сумм.» - суммарный клеточный лизат, «р.» - растворимая фракция белков,

«н/р» - нерастворимая фракция

На рис. 2 показан результат оптимизации режима индукции рекомбинантного гена. Видно, что максимальное количество EcuR в растворимой фракции достигается при 0.02mM IPTG, что в 5-50 раз меньше, чем концентрация этого лиганда, обычно используемая для индукции гена Т7 РНК-полимеразы, необходимой для транскрипции рекомбинантного гена (0.1-1mM). Такое кардинальное снижение концентрации IPTG позволило получить высокую степень продукции белка, токсичного для клетки при его быстром накоплении. Именно

поэтому при увеличении концентрации индуктора до стандартных 0.1mM практически весь EcuR оказывался в нерастворимой фракции (тельцах включения), что осложняло его последующее выделение и очистку.

Для очистки белка клетки размораживали на ледяной бане с добавлением 2 мл BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen, USA). Этот реагент был использован в качестве альтернативы традиционному буферу для лизиса клеток, содержащему Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA и 0.3 M NaCl. Его применение сокращает и упрощает процедуру подготовки лизата, не требует никаких других средств воздействия на клеточную стенку, в том числе ультразвуковой дезинтеграции, и способствует более полному переходу рекомбинантного белка в растворимую фракцию. Образовавшийся клеточный дебрис осаждали при 10000g (+4°C) в течение 10 минут.

Полученный лизат (рис. 3А, дорожка а) наносили на колонку для аффинной хроматографии (Bio-Rad, USA), содержащую 2мл Ni-NTA агарозы (Qiagen, Germany), заряженной сульфатом никеля (50mM) и предварительно промытой буфером для связывания, содержащим 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 и 150 mM NaCl. Перед элюцией белка EcuR колонку выдерживали в течение часа при комнатной температуре при непрерывном перемешивании для более полного связывания. Последующую элюцию проводили на льду, а ее схема была оптимизирована по объёму использованных буферов и концентрации в них имидазола. Лучшие результаты были получены при использовании следующей схемы: удаление несвязавшихся белков 15 мл буфера для связывания; ступенчатая промывка смолы этим же буфером, содержащем 30 mM имидазола (25 мл), 100 mM имидазола (10 мл) и 200 mM имидазола (4 мл). Для промывки смолы использовали 500mM имидазола. Скорость элюции в среднем составляла 25 мл/ч. Фракции собирали в стерильные эппендорфы по 1,5 мл. Наличие белка в пробах проверяли с помощью денатурирующего электрофореза в 12.5% ПААГ.

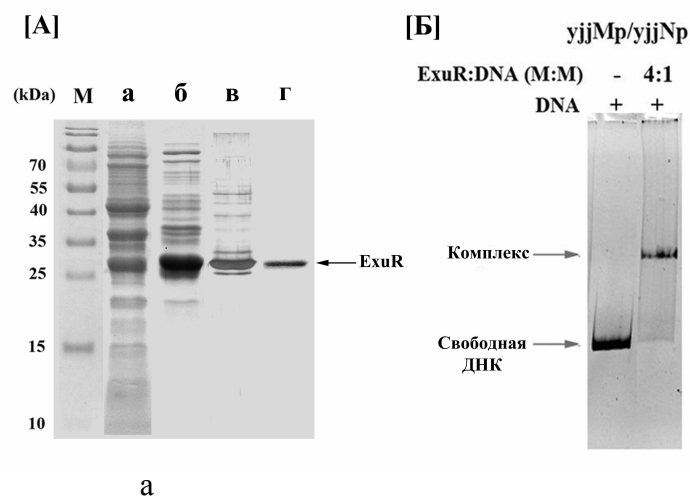


Рис. 3 А: Очистка белка EcuR путем аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе. Показаны результаты электрофоретического разделения разных фракций в денатурирующем ПААГ. М – маркеры молекулярного веса; а – суммарная клеточная фракция после индукции 0.02mM IPTG; б – суммарная фракция растворимых белков после обработки клеток BugBuster Protein Extraction Reagent; в – первичная элюция EcuR буфером, содержащем 200 mM имидазола; г – очищенный препарат белка, собранный из максимально чистых фракций после элюции буфером с 200 mM имидазола. Б: Оценка способности очищенного белка EcuR формировать комплексы с промоторной ДНК генов *yjjM/yjjN*. Молярное соотношение белка и ДНК 4:1. Места миграции свободной ДНК и образовавшегося комплекса идентифицированы прокрашиванием нитратом серебра.

Следует обратить внимание, на то, что оптимизированная нами схема элюции белка отличается от трёхступенчатого градиента по концентрации имидазола (30mM-200mM-500mM), рекомендованного производителем Ni-NTA агарозы (Qiagen). Мы добавили дополнительную промывку буфером, содержащим 100 mM имидазола и увеличили объём буфера с 30 mM имидазола с 15 до 25 мл, чтобы удалить ряд примесных белков и связанную с EхuR ДНК. Такая модификация позволила получить большое количество относительно чистого белка (рис. 3А, дорожка в). Однако для наших задач такой степени чистоты было недостаточно. Поэтому препарат белка, полученный на этой стадии очистки, подвергали повторному разделению на Ni-NTA агарозе после её тщательной промывки. Фракции белка с максимальным содержанием EхuR и минимальным количеством примесей объединяли, диализовали против буфера для связывания для освобождения от имидазола, и снова наносили на смолу. Препараты, полученные после 3-5 одинаковых циклов очистки содержали электрофоретически гомогенный EхuR (рис. 3А, дорожка г).

Для последующего хранения и использования белок концентрировали на колонках Millipore (USA) с порами, задерживающими полипептиды массой более 10 кДа, но пропускающими низкомолекулярные компоненты и соли. Колонки центрифугировали при 4000g (+4°C) в течение 10-15 минут. В зависимости от дальнейших целей белок диализовали против буфера для связывания (50mM Tris-HCl, pH 8.0; 150mM NaCl) или против буфера для длительного хранения (10mM Tris-HCl, pH 8.0; 50mM NaCl; 50% glycerol; 0.1mM EDTA; 1mM DTT). Концентрацию очищенного белка определяли на спектрофотометре Nanodrop ND-1000 (USA).

Функциональную активность EхuR оценивали методом EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) по его способности связываться с промоторной ДНК [14]. В качестве модельного промотора был использован регуляторный участок, расположенный между дивергентно транскрибируемыми генами *yjjM* и *yjjN*, экспрессия которых регулируется EхuR [8]. Фрагмент ДНК, содержащий промоторы генов *yjjM* и *yjjN*, длиной 193 н. п. был амплифицирован с геномной ДНК *E.coli* (праймеры *yjjM_F* 5'-GGATATGACCCCGCGCCATATC-3' и *yjjM_R* 5'-TTGTTGCSTTAGATATCAATG-3'). Комплексы с EхuR формировали в транскрипционном буфере (5 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM MgCl₂, 0.01 mM EDTA, 25 мкг/мл BSA, 5 mM NaCl) в течение 30 минут при 37°C. Далее в пробы (сохраняя температуру) добавляли глицерин до конечной концентрации 10% и наносили на предварительно прогретый до 37°C 5% ПААГ. Электрофорез проводили при 140mA/280V в течение 20 минут. Гель последовательно окрашивали бромистым этидием (выявляет место миграции ДНК) и нитратом серебра (обнаруживает как ДНК, так и белок). Результаты электрофоретического фракционирования свободной ДНК и ДНК-белковых комплексов показаны на Рис 3Б. Видно, что при четырёхкратном избытке EхuR почти все фрагменты ДНК оказываются связанными с EхuR, что уменьшает скорость их электрофоретической подвижности. Это значит, что очищенный белок функционально активен и может быть использован не только для получения антител, но и для детального биохимического исследования.

Обсуждение результатов

В соответствии с имеющимися литературными данными, EхuR регулирует транскрипцию генов, вовлеченных в переключение метаболизма клетки с гликолитического пути на альтернативные шунты [7-8, 15]. Это переключение может быть необходимо при росте клеток в условиях разных стрессов, в том числе

при изменении микроокружения в природной среде. Каждый регуляторный белок, участвующий в переходе клеток от метаболических процессов, характерных для нормальной жизнедеятельности, к выработке ответа на стресс, несомненно, важен для их конкурентноспособности в естественной среде обитания. Изучение регуляторного потенциала и биохимических свойств таких факторов транскрипции способствует пониманию молекулярных механизмов адаптивного ответа клеток и полноценной реконструкции глобальной сети регуляторных взаимоотношений для генов, находящихся под их контролем [16]. Кроме того, ранее полученные данные говорят о важности метаболического пути Энтнера-Дудорова для колонизации *E. coli*, т.е. прикрепления бактерий к эпителиальным клеткам слизистой оболочки кишечника [17]. Это значит, что всестороннее исследование EхuR важно не только для понимания его роли в ключевых процессах жизнеобеспечения бактерий, но и для поиска эффективных путей сдерживания нежелательной экспансии без существенного ущерба для бактериальной популяции и организма хозяина.

Работу с EхuR осложнил ряд его особенностей. Прежде всего, этот белок, так же, как большинство других факторов транскрипции в активном состоянии находятся в связанном с ДНК состоянии. Это существенно препятствует его выделению, так как значительная часть белка оказывается в нерастворимой фракции в виде комплекса, не способного связаться с колонкой. Кроме того, EхuR является ингибитором генов одного из важных метаболических путей, поэтому его избыточная продукция токсична для бактериальных клеток. Аналогичная закономерность была обнаружена и для других регуляторов семейства GntR [11, 12]. Для того чтобы устранить эти проблемы мы использовали несколько приёмов. Во-первых, ген *exuR* был клонирован в экспрессионный вектор вместе с собственной регуляторной областью, что позволяло использовать систему обратных связей для сдерживания его экспрессии в условиях индукции. Во-вторых, для индукции были использованы низкие концентрации IPTG, что также способствовало естественной адаптации клеток к накоплению ингибиторного белка. А для максимального извлечения EхuR был использован реагент BugBuster Protein Extraction Reagent, экстрагирующий белки, не подвергая их тепловой или кислотной денатурации, таким образом, снижая вероятность их удерживания в плохо растворимых комплексах. Разработанная схема очистки позволяет получить около 1мг белка высокой степени чистоты из 300 мл культуры клеток. Очищенный белок сохранял свою функциональную активность в течение нескольких недель при хранении на +4°C и нескольких месяцев при хранении на -20 °C. Получение чистого и активного препарата EхuR является ключевым этапом для его детального исследования, а также для обнаружения генов, экспрессия которых контролируется этим белком.

Исследования были поддержаны грантами РФФИ 12-04-01830 и 13-04-00997.

Список литературы

- 1.Salgado H., Peralta-Gil M., Gama-Castro S., Santos-Zavaleta A., Muñiz-Rascado L., García-Sotelo J.S. et al RegulonDB (version 8.0): Omics data sets, evolutionary conservation, regulatory phrases, cross-validated gold standards and more.// Nucleic Acids Research. 2013 Vol. 41 №D1: P. D203-D213.
- 2.Wingender E. TRANSFAC project as an example of framework technology that supports the analysis of genomic regulation. // Brief Bioinform. 2008. Vol. 9. P.326-332.

3. Rigali S., Derouaux A., Giannotta F., Dusart J. Subdivision of the Helix-Turn-Helix GntR Family of Bacterial Regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA Subfamilies. // The journal of Biol. Chem. 2002. Vol. 277. № 15. P. 12507-12515.
4. База данных <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
5. Van Alten D.M.F., DiRusso C.C., Knudsen J., Wierenga R.K. Crystal structure of FadR, a fatty acid-responsive transcription factor with a novel acyl coenzyme A-binding fold // The EMBO Journal. 2000. Vol. 19. № 19. P. 5167-5177.
6. Kelley L.A., Sternberg M.J.E. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server // Nature Protocols. 2009. Vol. 4. P. 363-371.
7. Mata-Gilsinger M., Ritzenthaler P., Blanco C. Characterization of the operator sites of the exu regulon in *Escherichia coli* K-12 by operator-constitutive mutations and repressor titration // Genetics. 1983. Vol. 105 № 4. P. 829-42.
8. Suvorova I.A., Tutukina M.N., Ravcheev D.A., Rodionov D.A. et al. Comparative genomics analysis of the hexuronate metabolism genes and their regulation in gammaproteobacteria // J. of Bacteriology. 2011. Vol. 193 № 15. P. 3956-3963.
9. Grainger D.C., Hurd D., Harrison M., Holdstock J., Busby S.J. Studies of the distribution of *Escherichia coli* cAMP-receptor protein and RNA polymerase along the *E. coli* chromosome // Proc Natl Acad Sci U S A. 2005. Vol. 102 № 49. P. 17693-17698.
10. Igarashi K., Ishihama A. Bipartite functional map of the *E. coli* RNA polymerase alpha subunit: involvement of the C-terminal region in transcription activation by cAMP-CRP // Cell. 1991. Vol. 65. P. 1015-1022.
11. Peekhaus N., Conway T. Positive and negative transcriptional regulation of the *Escherichia coli* gluconate regulon gene *gntT* by GntR and cyclic AMP (cAMP)-cAMP receptor protein complex // J. of Bacteriology. 1998. Vol. 180. № 7. P. 1777-1785.
12. Shulami S., Gat O., Sonenshein A.L., Shoham Y. The glucuronic acid utilization cluster from *Bacillus stearothermophilus* T-6 // J. of Bacteriology. 1999. Vol. 181. № 12. P. 3695-3704.
13. Davis B.J. Disc electroforesis II. Method and application to human serum protein // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1994. Vol. 121. P. 404-427.
14. Tutukina M.N., Shavkunov K.S., Masulis I.S., Ozoline O.N. Antisense transcription within the *hns* locus of *Escherichia coli* // Molecular biology. 2010. Vol. 44. № 3. P. 439-447.
15. Rodionov D.A., Mironov A.A., Rakhmaninova A.B., Gelfand M.S. Transcriptional regulation of transport and utilization systems of hexuronides, hexuronates and hexonates in gamma purple bacteria // Mol. Microbiol. 2000. Vol. 38. P. 673-683.
16. Рудаков О.Б., Востров И.А., Федоров С.В. и др. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии. Воронеж: Водолей, 2004. 526 с
17. Peekhaus N., Conway T. What's for dinner?: Entner-Doudoroff metabolism in *Escherichia coli*. // J. Bacteriol. 1998. Vol. 180. P. 3495-3502.

Потапова Анна Владимировна – магистрант УЦ «Биология клетки» Пущинского государственного естественно-научного института (ПущГЕНИ), инженер лаборатории функциональной геномики и клеточного стресса Института биофизики клетки РАН, Пущино, (4967) 739-140

Озольн Ольга Николаевна – д.б.н., профессор, зав. лабораторией функциональной геномики и клеточного стресса Института биофизики клетки РАН, Пущино

Тутукина Мария Николаевна – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории функциональной геномики и клеточного стресса Института биофизики клетки РАН, Пущино

Potapova Anna V. – master student of educational centre «Cell Biology» Pushchino State Institute of Natural Sciences, engineer in the laboratory of Functional genomics and cellular stress, Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Moscow region, e-mail: annapotapova1991@gmail.com

Ozoline Olga N. – Dr.Sci., professor, Head of the laboratory of Functional genomics and cellular stress, Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, e-mail: ozoline@rambler.ru

Tutukina Maria N. – PhD in Molecular biology, senior research scientist in the laboratory of Functional genomics and cellular stress, Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, e-mail: masha306@gmail.com