

УДК 57

**ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО
ВАКУОЛЯРНУЮ ИНВЕРТАЗУКАРТОФЕЛЯ В КЛЕТКАХ *E. COLI***

Ахметоллаева А.С.¹, Бактыгалиева А.К.^{1,2}, Манабаева Ш.А.^{1,2}

¹Национальный центр биотехнологии, Нур-Султан, Казахстан

² Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, Нур-Султан, Казахстане-
mail: manabayeva@biocenter.kz

Аннотация

Кислая вакуолярная инвертаза является ключевым ферментом, влияющим на содержание крахмала и сахаров в клубнях картофеля. В настоящее время достаточно много работ, в которых показана роль кислой вакуолярной инвертазы в накоплении редуцирующих сахаров в клубнях картофеля при продолжительном хранении на холоде, вызывающем ослабление клубней, что является отрицательным качеством при производстве картофелепродуктов. Целью настоящей работы является создание штамм-продуцента антигена кислой вакуолярной инвертазы картофеля. Для клонирования в экспрессионную плазмиду рЕТ-28с использовали кДНК кислой вакуолярной инвертазы картофеля (*Solanum tuberosum* L.) длиной 1920 п.н. В результате трансформации экспрессионного плазмидного вектора рЕТ-28/*Pain-1* в штамм *E.coli* BL21 создан штамм-продуцент антигена кислой вакуолярной инвертазы.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum* L., кислая вакуолярная инвертаза, антиген, экспрессия, ИПТГ, *Escherichia coli*.

В картофеле (*Solanum tuberosum*) углерод хранится в виде крахмальных полимеров в

клубнях. Кроме крахмала, клубни также содержат небольшое количество сахарозы, глюкозы и фруктозы. Количество крахмала и сахаров, присутствующих в клубнях, зависит от генотипа и факторов окружающей среды. Хранение клубней при низкой температуре (например, 4°C) в течение нескольких недель приводит к превращению небольшой доли крахмала в сахар с последующим накоплением глюкозы и фруктозы [1,2]. Этот феномен "холодового подслащивания" является адаптивной реакцией на холодовой стресс, поскольку сахара, как давно известно, обладают осмопротекторной функцией в растениях [3]. Инвертазы вместе с другими белками играют роль в определении содержания сахара в клубнях до и во время холодного хранения. Активность инвертазы присутствует в клубнях и увеличивается при холодном хранении [4-6]. Транскрипты вакуолярной инвертазы накапливаются в клубнях при холодном хранении [7-9], а ингибирование антисмысла инвертазы изменяет соотношение гексозы к сахарозе в клубнях [8]. Содержание редуцирующих сахаров глюкозы и фруктозы в клубнях является важным критерием качества для картофелеперерабатывающей промышленности [10].

Пять генов кислотной инвертазы, *Pain-1*, *Invge*, *INVGF*, *InvCD111* и *InvCD141* были обнаружены в картофеле [11-14]. Ген *Pain-1*, расположенный на хромосоме III, кодирует единственную копию вакуолярной инвертазы. Остальные четыре гена расположены на хромосомах IX или X и кодируют апопластические инвертазы [15]. Было обнаружено, что последовательность кДНК вакуолярной инвертазы картофеля примерно на 50% идентична кДНК апопластической инвертазы [16]. Ген вакуолярной инвертазы *Pain-1 S.tuberosum* имеет протяженность около 4 т.п.н. и состоит из семи экзонов и шести интронов [14].

В текущее время довольно много работ, в которых показана роль вакуолярной инвертазы в холодовом осахаривании картофеля, катализирующая необратимый гидролиз сахарозы [17]. Учеными доказано понижение скопления редуцирующих сахаров в клубнях при низких температурах при помощи инактивации гена вакуолярной инвертазы *Pain-1* [18, 19].

Материалы и методы

Для данной исследовательской работы был использован картофель *S.tuberosum* сорт Аксор. Так же использовали штамм *E.coli* BL21 и ген *Pain-1*, клонированный в вектор pET-28с.

Выделение РНК из клеток растений

РНК выделяли из стерильного растительного материала клубней картофеля *S.tuberosum* сорта Аксор с использованием реагента Тризол. РНК выделяли из 0,1 г измельченной мякоти клубней, к которой добавили 1000 мкл реагента Тризол, далее центрифугировали при 12000g в течение 5 минут при температуре 4°C. Продукты ПЦР разделяли в 2% агарозном геле и визуализировали после окрашивания бромистым этидием по стандартной методике.

Синтез кДНК

Синтез кДНК кодирующей последовательности гена кислой вакуолярной инвертазы картофеля сорта Аксор осуществляли с помощью набора SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen 18064-014), согласно инструкции производителя.

Конструкция экспрессионного вектора pET-28с

Плазмиду pET-28с гидролизовали рестриктазами NotI и NdeI. Интегрировали ген *Pain-1* в векторную плазмиду pET-28с по тем же сайтам рестрикции. Выделение плазмиды осуществлялось с использованием набора Miniprep Kit (Qiagen) по протоколу производителя.

Трансформация и экспрессия белка кислой вакуолярной инвертазы

Трансформацию компетентных клеток BL21 плазмидным вектором pET-28с/*Pain-1* проводили методом электропорации с использованием MicroPulser (BioRad), время переноса составляло 5,4 мс. Отобранные клетки *E. coli* BL21 выращивали при 37°C и при 170 об/мин, до оптической плотности при 0,8 (OD=800) и вносили индуктор - изопропил - β-D-1-галактопиранозид (ИПТГ) в концентрации 300 мкМ, инкубировали в течение 3 ч при 37°C. Затем клетки собирали с использованием центрифуги при +4°C, 12000g в течение 5 минут.

Выделение белка

Осажденные клетки с 1 л культуры ресуспендировали в 50 мл буфера А (20mM Tris-HCl, 1mM EDTA-Na, pH 8.0) во льду. Добавили лизоцим до концентрации 1 мг/мл, инкубировали 20 минут. Провели гомогенизацию в ультразвуковом гомогенизаторе 5-10 раз по 30 секунд с перерывом 2-5 минут. Добавили Triton X-100 до 0,1% (0,5 мл 10% Triton X-100). Перемешали и инкубировали 10 мин при 37°C. Добавили хлорид магния до 8 mM (0,4 мл 1M MgCl₂) и ДНКазу I до концентрации 1 мкг/мл. После инкубации на льду в течение 10 минут центрифугировали в течение 20 мин (18000g) при +4°C. После центрифугирования промыли осадок 2 раза по 10 мл буфера Б (А+ 1% Nonidet P40), затем промыли осадок 10 мл буфера В (А+ 200mM NaCl). Осадок растворили в 10 мл UB-10 (UB + 10mM имидазол pH 8.0). Все дальнейшие процедуры проводили при комнатной температуре, центрифугировали 15 минут, на максимальных оборотах.

Хроматографическая очистка белка

Очистку белка из телец включения проводили при комнатной температуре с помощью набора на Ni - NTA сефарозе (HisTrap FF), с использованием колонку на 5 мл.

Электрофорез

Электрофоретическое разделение белков проводили в полиакриламидном геле. Для хорошей денатурации белков, проводили температурный прогрев при 95°C в течение 5 минут. Электрофорез осуществляли при 100В, затем 180В в течение 2 часов. Гель окрашивали с помощью красителя кумасси бриллиантовый синий R-250 (Sigma).

Результаты

После выделения РНК была синтезирована кДНК кислой вакуолярной инвертазы. Кодированная последовательность кислой вакуолярной инвертазы состоит из 1920 п.н. и кодирует 640 аминокислот. На рисунке 1, показан ПЦР продукт, полученный с помощью кДНК и праймеров на кодирующую последовательность кислой вакуолярной инвертазы.

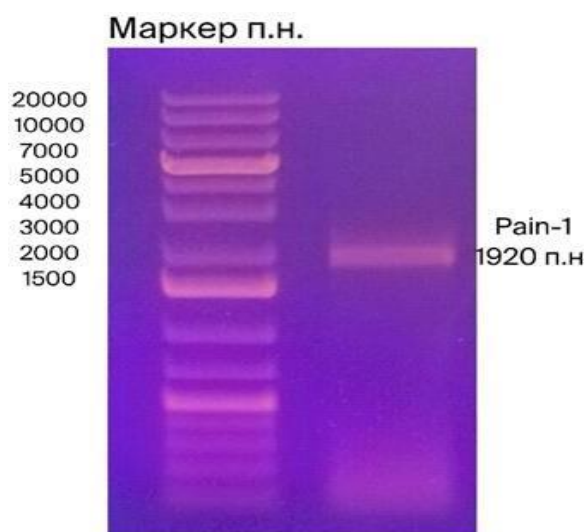


Рис. 1. Электрофоретическое разделение молекул в 1% агарозном геле: маркер 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific); Полученный в результате ПЦР реакции ампликон, равный 1920п.о.

С целью экспрессии белка Pain-1 в клетках *E.coli* был получен плазмидный вектор pET-28c/Pain-1 (рис. 2).

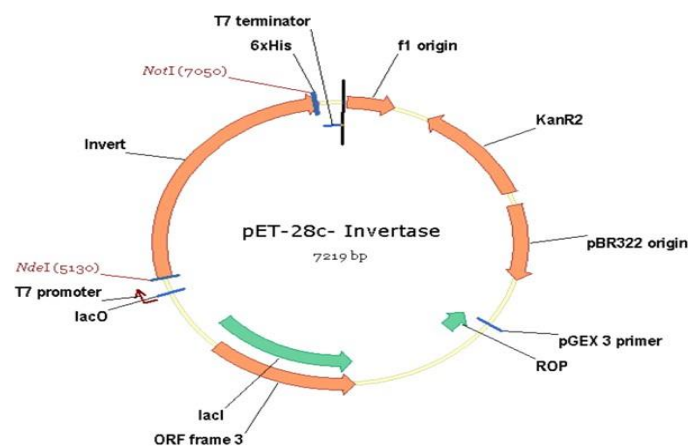


Рис. 2. Плазмидная конструкция pET-28/Pain-1

Для экспрессии белка Pain-1 был сконструирован вектор с 6xHis-меткой на N-конце. Экспрессионная плазида с клонированным геном *Pain-1* обозначена как pET-28c/*Pain-1*. Для работы были использованы штаммы *E. coli*. Штамм *E. coli* BL21 (DE3) является наиболее распространенным прокариотическим штаммом, используемым для экспрессии рекомбинантных белков [20].

Плазмиду pET-28c/*Pain-1* трансформировали в клетки *E. coli* BL21. После наработки бактериальной культуры BL21/pET-28c/*Pain-1* и индукции при помощи ИПТГ осуществили проверку уровня экспрессии белка Pain-1. Экспрессию белка контролировали с помощью анализа SDS-PAGE. Анализ SDS-PAGE показал, что одна основная полоса с молекулярной массой 73 кДа выявила основное различие между лизатами бактериальных клеток до и после индукции ИПТГ. Так же результаты анализа показали, что целевой белок уходит в тельца включения, и он относится по своим свойствам к нерастворимым белкам. Максимальное накопление целевого белка происходит после того, как добавили ИПТГ и инкубировали суспензию клеток в течение 3 часов при 37°C.

Белок Pain-1 с 6xHis на N-конце был очищен от лизата бактериальных клеток методом аффинной хроматографии. При очистке белкового лизата аффинной хроматографией на колонке Ni-NTA сефароза с использованием буфера UB с 8М мочевиной и иммидазолом получили наибольшее количество целевого белка.

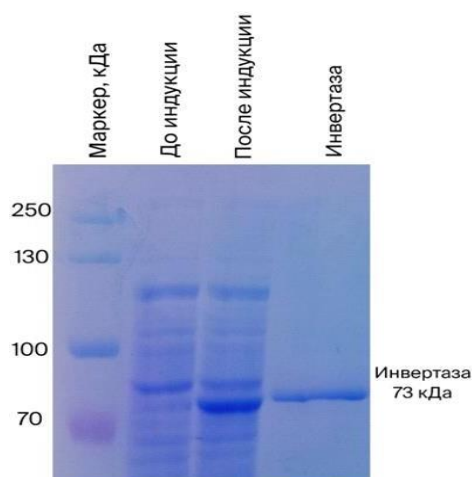


Рис. 3. Электрофоретическое разделение белковых фракций в 7,5% ПААГ. Белковый маркер молекулярных весов (Thermo scientific); контроль суспензии клеток до и после добавления ИПТГ; фракция белка (73кДа) после очистки антигена Pain-1 методом аффинной хроматографии на ионах никеля Ni²⁺

Элюированный белок Pain-1, меченный б^хHis, появился в виде одной полосы (после очистки аффинной хроматографией и SDS-PAGE) с приблизительной молекулярной массой 73 кДа (рис.3). Выход рекомбинантного белка Pain-1 составлял 20 мг/л бактериальной культуры.

Обсуждение

Путем оптимизации и подбора условий удалось получить максимальное количество белка (20 мг из 1л культуры суспензии клеток) для дальнейшей иммунизации кроликов. В ходе экспериментов, были использованы различные условия выделения и очистки белка кислой вакуолярной инвертазы. В конечном варианте самым оптимальным стало выделение белка из телец включения, и так как белок нерастворимый, очищали его через колонку с 8М мочевиной. Остальные способы не показали значительного выхода белка и не были использованы для дальнейшей работы. Возможно, также белок Pain-1 токсично влияет на сами клетки *E.coli* при культивировании. Такие выводы были нами сделаны, так как полученного рекомбинантного белка инвертазы, в отличие от других рекомбинантных белков, полученных нами при тех же условиях нашей лаборатории, было намного меньше. Очищенный рекомбинантный белок Pain-1 в дальнейшем будет применяться в качестве иммуногена для получения антител кислой вакуолярной инвертазы.

Заключение

Таким образом, результаты данной работы показали, что кДНК кислой вакуолярной инвертазы состоит из 1920 п.н. и молекулярная масса белка Pain-1, кодирующего антиген, составляет 73кДа. Полученная нами экспрессионная система на основе сконструированного плазмидного вектора, содержащего ген белка кислой вакуолярной инвертазы рЕТ-28с/*Pain-1* в клетках штамма *E.coli* BL21 показала хорошую способность к экспрессии антигена Pain-1. Полученный антиген будет в дальнейшем применен при получении антител для детекции кислой вакуолярной инвертазы с помощью иммуноферментного анализа.

Литература

1. Isherwood FA: Starch-sugar interconversion in *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* 1973, 12:2579-2591.
2. Sowokinos J: Biochemical and molecular control of cold-induced sweetening in potatoes. *American Journal of Potato Research* 2001, 78(3):221-236.
3. Müller-Thurgau H: Über Zuckerrückbildung in Pflanzentheilen in Folge niedrigerer Temperatur. *Landwirtsch Jahrb* 11 1882, 751-828.
4. Richardson DL, Davies HV, Ross HA, Mackay GR: Invertase activity and its relation to hexose accumulation in potato tubers. *J Exp Bot* 1990, 41(1):95-99.
5. Pressey R: Role of invertase in accumulation of sugars in cold stored potatoes. *Am Pot J* 1969, 46:291-297.
6. Pressey R, Shaw R: Effect of temperature on invertase, invertase inhibitor, and sugars in potato tubers. *Plant Physiol* 1966, 41:1657-1661.
7. Bagnaresi P, Moschella A, Beretta O, Vitulli F, Ranalli P, Perata P: Heterologous microarray experiments allow the identification of the early events associated with potato tuber cold sweetening. *BMC Genomics* 2008, 9(1):176.
8. Zrenner R, Schüler K, Sonnewald U: Soluble acid invertase determines the hexose-to-sucrose ratio in cold-stored potato tubers. *Planta* 1996, 198(2):246-252.
9. Zhou D, Mattoo A, Li N, Imaseki H, Solomos T: Complete nucleotide sequence of potato tuber acid invertase cDNA. *Plant Physiology* 1994, 106:397-398.
10. Chen X, Salamini F, Gebhardt C: A potato molecular-function map for carbohydrate metabolism and transport. *Theor Appl Genet* 2001, 102(2):284-295.
11. Zrenner R, Schüler K, Sonnewald U (1996) Soluble acid invertase determines the hexose-to-sucrose ratio in cold-stored potato tubers. *Planta* 198: 246–252.
12. Zhou D, Mattoo A, Li N, Imaseki H, Solomos T (1994) Complete nucleotide sequence of potato tuber acid invertase cDNA. *Plant Physiol* 106: 397–398.

13. Hedley P, Machray G, Davies H, Burch L, Waugh R (1994) Potato (*Solanum tuberosum*) invertase-encoding cDNAs and their differential expression. *Gene* 145: 211–214.
14. Draffehn AM, Meller S, Li L, Gebhardt C (2010) Natural diversity of potato (*Solanum tuberosum*) invertases. *BMC Plant Biol* 10: 271. doi:10.1186/1471-2229-10-271.
15. Chen X, Salamini F, Gebhardt C (2001) A potato molecular-function map for carbohydrate metabolism and transport. *Theor Appl Genet* 102: 284–295.
16. Liu X, Zhang C, Ou Y, Lin Y, Song B, et al. (2011) Systematic analysis of potato acid invertase genes reveals that a cold-responsive member, *StvacINV1*, regulates cold-induced sweetening of tubers. *Mol Genet Genomics* 286: 109–118. doi:10.1007/s00438-011-0632-1.
17. Слугина М.А. С. Е. А., Рыжова Н.Н., КочиеваЕ.З. . Структура и полиморфизм фрагмента локуса *Pain-1*, кодирующего вакуолярную инвертазу видов *Solanum*. // Молекулярная биология. – 2013. – V. 47, № 2. – P. 243-250.
18. Bhaskar P. B., Wu L., Busse J. S., Whitty B. R., Hamernik A. J., Jansky S. H., Buell C. R., Bethke P. C., Jiang J. Suppression of the vacuolar invertase gene prevents cold-induced sweetening in potato // *Plant Physiol.* – 2010. – V. 154, № 2. – P. 939-48.
19. Ye J., Shakya R., Shrestha P., Rommens C. M. Tuber-specific silencing of the acid invertase gene substantially lowers the acrylamide-forming potential of potato // *J Agric Food Chem.* – 2010. – V. 58, № 23. – P. 12162-7.
20. Rosano GL, Ceccaelli EA (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 5:1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>