

УДК 616-092

## Клонирование кДНК S100B в *E. coli* под контролем индуцибельного промотора, и ее гетерологичная экспрессия

Нурбеков М.К.<sup>1</sup>, Терёхина О.Л.<sup>1</sup>, Дмитренко О.П.<sup>2</sup>, Лобанов А.В.<sup>1,3</sup>, Лобанова Н.Н.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

<sup>2</sup> Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы». 107014, Москва, ул. Стромынка, д.10

<sup>3</sup> Филиал федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» Российской академии наук. 142290, Московская область, Пушкино, пр. Науки, д. 6

<sup>4</sup> ООО «Церера». 142290, Московская область, Пушкино, микрорайон Д, д. 20А, помещение 7Б

*В работе разработана стратегия клонирования и экспрессии кДНК S100B с использованием эффективной и многофункциональной онлайн программы Genome compiler на основе векторной системы pBT7-N-His, имеющей промотор РНК-полимеразы фага T7, участок клонирования и экспрессии с ключевыми элементами контроля и регуляции процессов транскрипции и трансляции. Экспрессия белка S100B подтверждена процедурой SDS-ПААГЭ по молекулярной массе выявленных на электрофорезе полос с динамикой накопления относительно контроля при увеличении времени инкубации после индукции с IPTG. Полученная гетерологичная экспрессия белка S100B с сохранением основных физико-химических свойств и биологической активностью открывает хорошие перспективы его применения в качестве информативного маркера состояний организма в норме и при патологии, и в качестве ценного объекта направленной терапии.*

**Ключевые слова:** гетерологичная экспрессия кДНК; рекомбинантный белок S100B; векторная система pBT7-N-His; стратегия клонирования и экспрессии; Genome compiler; фолдинг белка; дисульфидные связи; аналитическая и препаративная экспрессия белков; металл-аффинная хроматография белков.

**Для цитирования:** Нурбеков М.К., Терёхина О.Л., Дмитренко О.П., Лобанов А.В., Лобанова Н.Н. Клонирование кДНК S100B в *E. coli* под контролем индуцибельного промотора, и ее гетерологичная экспрессия. *Патогенез*. 2018; 16(4): 148-152

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2018.04.148-152

**Для корреспонденции:** Нурбеков Малик Кубанычбекович, e-mail: mlkn47@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 13.10.2018

## Cloning of S100B cDNA into *E. coli* under the control of an inducible promoter and its heterologous expression

Nurbekov M.K.<sup>1</sup>, Terekhina O.L.<sup>1</sup>, Dmitrenko O.P.<sup>2</sup>, Lobanov A.V.<sup>1,3</sup>, Lobanova N.N.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

<sup>2</sup> Moscow City Tuberculosis Research and Practical Center, Stromynka Str. 10, Moscow 107014, Russian Federation

<sup>3</sup> Branch of the M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Prospekt Nauki 6, Pushchino of Moscow Region 142290, Russian Federation

<sup>4</sup> Tserera LLC, microdistrict D 20A of. 7B, Pushchino of Moscow Region 142290, Russian Federation

*To investigate the structure and functions of the S100B protein in cells and tissues, the heterologous expression of S100B cDNA was studied on E. coli. A strategy for cloning and expression of S100B cDNA was developed using an efficient and multifunctional online program, Genome Compiler, based on a pBT7-N-His vector system, with a which had a phage T7 RNA polymerase promoter and a cloning and expression site with key elements for control and regulation of transcription and translation. The E. coli strain, BL-21 (DE3) containing the DE3 prophage with the T7 RNA polymerase gene under the control of the lac promoter was used for the expression. The expression of S100B protein was confirmed by the SDS-PAGE procedure, and preliminary studies were performed to optimize the expression procedure. The obtained heterologous expression of the protein with preserved basic physicochemical properties and biological activity opens good prospects for using it as an informative marker of the body state in normal and pathological conditions and as a valuable target of therapy.*

**Keywords:** heterologous cDNA expression; recombinant protein S100B; pBT7-N-His vector system; cloning and expression strategy; Genome compiler; protein folding; disulfide bonds; analytical and preparative protein expression; metal affinity protein chromatography.

**For citation:** Nurbekov M.K., Terekhina O.L., Dmitrenko O.P., Lobanov A.V., Lobanova N.N. [Cloning of S100B cDNA into *E. coli* under the control of an inducible promoter and its heterologous expression]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2018; 16(4): 148-152 (in Russian).

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2018.04.148-152

**Corresponding author:** Nurbekov Malik Kubanychbekovich, e-mail: mlkn47@mail.ru

**Funding.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received:** 13.10.2018

## Введение

Спецификой современного этапа развития технологий генетической инженерии является существенный рост значимости *in silico* этапа в дизайне процедур клонирования и экспрессии генов. Целью нашего исследования было получение функционально активного рекомбинантного белка S100B, с помощью его гетерологичной экспрессии в *E. coli* с применением векторных систем с индуцибельным промотором и высоким уровнем экспрессии, с последующим анализом на основные физико-химические свойства белка для его идентификации.

Нами использовалась широко применяемая для подобных работ онлайн программа Genome compiler [1]. Программа позволяет осуществлять дизайн процедур клонирования во всех основных существующих платформах [2]. Была выбрана система экспрессии на основе использования промотора РНК-полимеразы бактериофага T7 и штамма *E. coli* BL-21, содержащего профаг  $\lambda$ DE3, кодирующий T7 РНК-полимеразу под контролем индуцибельного lacUV5 промотора.

## Материалы и методы исследования

Синтез кДНК и клонирование в *pBT7-N-His*, основные аспекты применения онлайн программы *Genome Compiler*.

Стратегию клонирования кДНК S100B, разрабатывали с использованием пакета программ *Genome compiler* (<https://designer.genomcompiler.com/app>).

Синтез последовательности кДНК S100B с учетом частоты использования кодонов *E. coli* осуществляли на фирме «BioNeer» (Южная Корея). кДНК встраивали в плазмидную ДНК вектора *pBT7-N-His* ([http://eng.bioneer.com/products/GeneSynthesis/pdf/Bioneer\\_pBT7-N-His.pdf](http://eng.bioneer.com/products/GeneSynthesis/pdf/Bioneer_pBT7-N-His.pdf)) по сайту рестрикции EcoRY («Сибэнзим», Москва) по «тупым концам» – как описано в [3].

Проведение трансформации в клетки *E. coli* штамма *XL-blue*, выделение плазмидной ДНК и ее характеристика.

Трансформацию плазмидной ДНК проводили в соответствии с [3]. После процедуры подращивания трансформированных клеток 100 мкл суспензии трансформированных клеток высевали на чашку с LB-агаром с ампициллином (50 мкг/мл), 0,5 мМ IPTG и 0,2 мг/мл X-Gal. Инкубировали в течение ночи, при 37°C. Для выделения плазмидной ДНК для скрининга отбирали белые колонии.

Выделение плазмидной ДНК проводили в соответствии с алгоритмом программы (<https://bio-protocol.org/bio101/e30>). Для рестрикционного анализа полученных препаратов рекомбинантной плазмиды ее обрабатывали рестриктазой EcoRI («Сибэнзим», Москва) по протоколу фирмы.

Для амплификации участка клонирования и экспрессии плазмиды со вставкой использовали ПЦР со стандартными затравками к T7 промотору (T7F затравка) и T7 терминатору (T7R затравка), как указано в программе ([http://molbiol.ru/protocol/12\\_07\\_06.html](http://molbiol.ru/protocol/12_07_06.html)). Применяли SP-Taq-полимеразы («Сибэнзим», Москва) в соответствии с протоколами фирмы. Продукт ПЦР реакции

анализировали электрофорезом в 1% геле агарозы в ТА-Е-буфере при напряженности электрического поля ~6 В/см, в течение 1-1,5 часа. Гели визуализировали на трансиллюминаторе УВТ-1 («Биоком», Москва).

Экспрессия S100B кДНК в составе рекомбинантной плазмиды *pBT7-N-His-S100B03* в клетках *E. coli* штамма BL-21(DE3) и его анализ на основные физико-химические свойства методом SDS денатурирующего электрофореза в ПААГ (SDS-ПААГЭ)

Трансформацию ДНК плазмидой *pBT7-N-His-S100B03* соответствующего штамма *E. coli* BL-21(DE3) («Евроген», Москва) осуществляли, как описано выше. Клетки BL-21(DE3) с рекомбинантной плазмидой подвергали процедуре экспрессии с использованием IPTG в качестве индуктора по прописи фирмы поставщика компетентных клеток («Евроген», Москва). Аликвоту индуцированной бактериальной культуры после культивирования до 4,5 часов в 1-2 мл осаждали центрифугированием при 10 тыс. об/мин в течение 5 мин., супернатант сливали, осадок клеток тщательно суспендировали в 1-кратной смеси для нанесения на ПААГ гель при SDS денатурирующем электрофорезе (SDS-ПААГЭ), прогревали на кипящей водяной бане 10 мин., центрифугирования при 10 тыс. об./мин. в течение 10 мин., наносили аликвоту 5-10 мкл супернатанта на 10% ПААГ гель и разделяли в системе Лэммли ([http://molbiol.ru/protocol/17\\_01.html](http://molbiol.ru/protocol/17_01.html)). Электрофорез проводили при напряжении 75 В в течение 2-3 часов.

## Результаты исследования

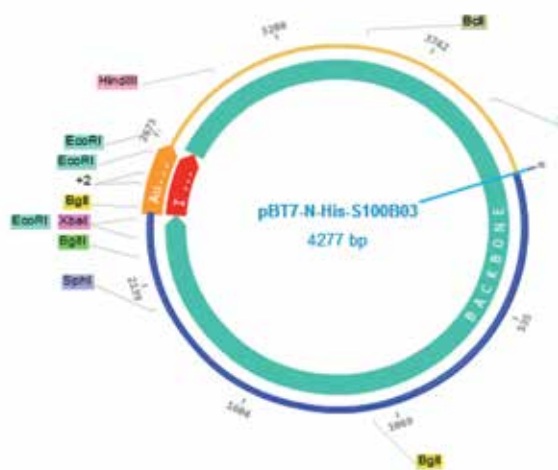
Схема сконструированной *in silico* рекомбинантной плазмиды *pBT7-N-His* приведена на рис. 1.

Полученную последовательность кДНК S100B человека синтезировали на фирме «BioNeer» (Корея) в силу преимуществ данного подхода, включающих скорость, точность, чистоту препарата, относительную дешевизну. В качестве вектора клонирования и экспрессии использовали векторную систему *pBT7-N-His* в силу ее высокой эффективности.

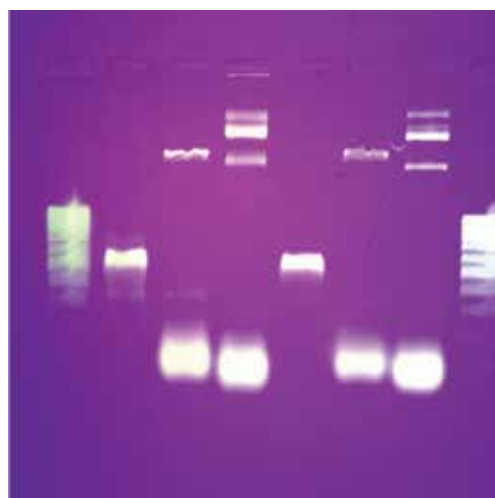
Процедуры клонирования включали рестрикцию вектора по уникальному сайту EcoRY, с последующими процедурами дефосфорилирования концов вектора и фосфорилирования кДНК вставки. Для повышения эффективности клонирования использовали 10-кратный избыток вставки над вектором. Особенностью выбранной в работе процедуры лигирования с T4-ДНК-лигазой было применение двухступенчатой методики. Для трансформации лигата в клетки *XL-blue* отбирали до 10 белых по цвету колоний для выделения плазмидной ДНК и проверяли наличие вставки с помощью рестрикционного анализа с рестриктазой EcoRI (рис. 2) и в реакции ПЦР с затравками, соответствующими T7 промотору и терминатору.

На рис. 1 видно наличие фрагмента, соответствующего «телу» плазмиды (см. карту) и вставки, также соответствующей по длине приведенной карте рекомбинантной плазмиды. Длина ПЦР продукта (около 500 п.н.) с T7 затравками строго соответствует предполагаемой, исходя из наличия встроенного по сайту EcoRY синтетического фрагмента кДНК S100B. Рестрикция реком-

А

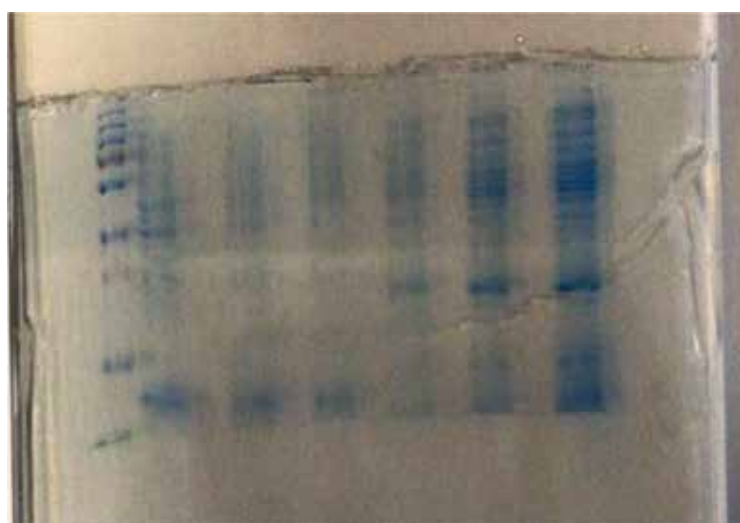


Б

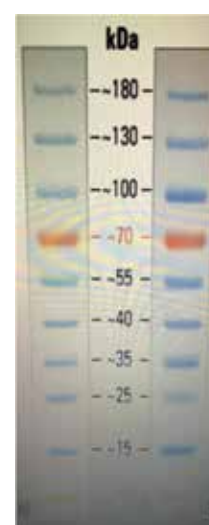


**Рис. 1.** А – кольцевая форма рекомбинантной плазмиды pBT7-N-His-S100B03. Рекомбинантная плазида, сконструированная *in silico* с использованием онлайн программы *Genome compiler* (<https://designer.genomecompiler.com/app>). Б – картина электрофоретического разделения результатов рестриктазного анализа и ПЦР анализа рекомбинантной плазмиды pBT7-N-His-S100B03 (клоны №1 и №3). Последовательно слева направо: 1 – ДНК-маркёр 100 – 1000 п.н.; 2 – ПЦР амплификат плазмидной ДНК с использованием T7-затравок клон № 1 (см. текст); 3 – рестрикция плазмидной ДНК по *EcoRI* клон № 1; 4 – исходная плазмидная ДНК клон № 1; 5 – ПЦР амплификат плазмидной ДНК с использованием T7-затравок клон № 3; 6 – рестрикция плазмидной ДНК по *EcoRI* клон № 3; 7 – исходная плазмидная ДНК клон № 3; 8 – ДНК-маркёр 100 – 1000 п.н.

А



Б



**Рис. 2.** А – Картина разделения экстракта клеток BL21(DE3) с рекомбинантной плазмидой, содержащей вставку кДНК S100B, под контролем индуцибельного T7 промотора. Дорожка 1 – разделение смеси белков маркеров. Проба экстракта сразу после индукции 1 мМ IPTG в течение 10-15 мин. (2 и 4 дорожки, для клонов № 1 и 3, соответственно), после 3 часов (дорожка 3 и 6, для клонов № 1 и 3, соответственно) и 4,5 часа (дорожка 4 и 7, для клонов № 1 и 3, соответственно). Инкубация при 37°C и интенсивном перемешивании (200 оборотов/мин). Б – картина распределения молекулярных масс в смеси маркеров после SDS-ПААГЭ.

бинантных клонов № 1 и № 3 плазмиды pBT7-N-His-S100B03 по *EcoRI* приводит к выщеплению фрагмента в 320 п.н. (рис. 2, Б дорожка 3), содержащего вставку кДНК S100B с фланкирующими последовательностями участка клонирования и экспрессии.

Отобранные по рестриктазному анализу клоны проверяли на сиквенс на фирме «Евроген» (Москва). Были отобраны клоны № 1 и № 3, содержащие вставку в правильной ориентации и в правильной рамке считывания, относительно промотора с лидерной последовательностью N-His Tag.

Рекомбинантные клоны №1 и № 3, охарактери-

зованные с помощью рестриктазного анализа, ПЦР амплификации и секвенирования, изучили на аналитическую экспрессию. Штаммы BL-21(DE3) *E. coli* трансформировали ДНК плазмиды pBT7-N-His-S100B03 соответствующих клонов, осуществляли процедуру аналитической экспрессии и подвергали SDS-ПААГЭ. На рис. 2, Б четко видна экспрессия полосы, соответствующей мономерной форме белка (полоса в районе 10 кДа по белковым маркерам, дорожки 2-4). Клоны имели разную динамику экспрессии рекомбинантного белка и распределение димерной и мономерной форм, что подтверждает необходимость

оптимизации всех основных параметров процедуры экспрессии белка [4].

Видна быстрая динамика экспрессии белка S100B сразу после добавления IPTG индуктора, которая практически не меняется с небольшим снижением после 4,5 часов инкубации (рис. 2, Б – полоса в районе 10 кДа по белковым маркерам, дорожки 2-4). В случае клона № 3 видно заметное увеличение экспрессии белка, соответствующего димерной формы S100B (молек масса 21 кДа).

### Обсуждение

Основной предпосылкой начала цикла структурно функциональных исследований белков является доступность его в препаративных количествах, что и определяет необходимость их гетерологичной экспрессии в бактериальных системах, в частности в *E. coli*. *Большим преимуществом использованной нами программы GenomE compiler является простота ввода и вывода информации, манипуляций в ходе процедур сборки рекомбинантных молекул и хранения результатов дизайна рекомбинантных ДНК. Преимуществом использованного вектора для клонирования и экспрессии pBT7-N-His является возможность встраивать нужные последовательности ДНК по уникальному сайту рестрикции EcoRY. Данная рестрикция вектора, давая «тупые» 3'-концы, позволяет при встраивании фрагментов исследуемых кДНК, начинающихся с иницирующих кодонов и имеющих «тупые» 5'-концы, получать правильные рамки считывания экспрессируемой последовательности кДНК. Это особенно удобно при встраивании синтетических молекул кДНК, которые начинаются с иницирующего кодона, как и в нашем случае с кДНК S100B. В связи с этим нами выбрана данная стратегия клонирования и экспрессии. Методики клонирования по «тупым концам» подробно описаны в руководстве [3], следуя которым нами и была осуществлена процедура клонирования кДНК S100B.*

Для отбора версии рекомбинантного клона, имеющей вставку кДНК S100B в правильной ориентации, нами проведен цикл процедур по рестриктазному анализу, ПЦР анализу области клонирования и экспрессии рекомбинантной плазмиды и, наконец, секвенированию области с обоих концов. По результатам этих исследований нами были отобраны 2 клона (№ 1 и №3), соответствующих нужным критериям. Дальнейшая работа предполагала проведение процедуры пробной экспрессии полученных клонов с рекомбинантным вектором идентификация рекомбинантного белка по молекулярной массе, соответствующей 10 кДа для мономерной формы белка. Для этого использовали трансформацию плазмиды в штамм *E. coli* BL-21 (DE3), проведение инкубации бактериальной культуры, и ее индукции с IPTG по прописи поставщика компетентных клеток. После проведения SDS-ПААГЭ установлена четкая экспрессия белка с полосой, строго соответствующей ожидаемой молекулярной массе по примененным маркерам, разделенным в том же геле в параллельной дорожке.

Как известно, белок S100B обладает целым рядом набором биологических функций, важных для обмена

веществ, развития, дифференциации и функционирования организма на различных уровнях. Уже доказанным является важность белка и его применений в качестве информативного биомаркера целого спектра распространенных патологий, психопатологий, болезней, ассоциированных со старением [5-7]. Кроме того, S100B и другие белки данного класса могут выступать в качестве важных мишеней для создания новых методик направленной терапии патологий. Получение рекомбинантного белка S100B с нативными свойствами открывает перспективы дальнейших фундаментальных и прикладных исследований по применению данного белка для создания оригинальных систем диагностики и мониторинга, связанных с S100B патологий, а также для изучения молекулярных механизмов PPI взаимодействий в системе S100B/RAGE – рецептор как ключевого звена передачи сигналов в клетке и организме.

### Заключение

Полученная гетерологичная экспрессия белка S100B с сохранением основных физико-химических свойств и биологической активностью открывает хорошие перспективы применения данного белка в качестве информативного маркера состояний организме в норме и при патологии, и в качестве ценного объекта направленной терапии.

### Список литературы

1. Bates M., Lachoff J., Meech D., Zulkower V., Moisy A., Luo Y., Tekotte H., Franziska Scheitz C.J., Khilari R., Mazzoldi F., Chandran D., Groban E. Genetic Constructor: An Online DNA Design Platform. *ACS Synth Biol.* 2017; 6(12): 2362-2365. DOI: 10.1021/acssynbio.7b00236
2. Kirchmaier S., Lust K., Wittbrodt J. Golden GATEway cloning – a combinatorial approach to generate fusion and recombination constructs. *PLoS One.* 2013; 8(10): e76117. DOI: [10.1371/journal.pone.0076117]
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 479 с.
4. Rosano G.L., Seccarelli E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Fron.t Microbiol.* 2014; 5: 172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172
5. Актуальные проблемы нейроиммунопатологии / Под ред.: Г.Н. Крыжановского, С.В. Магаевой, С.Г. Морозова. М.: Гениус Медиа; 2012. 424 с.
6. Крыжановский Г.Н., Акмаев И.Г., Магаева С.В., Морозов С.Г. Нейроиммуноэндокринные взаимодействия в норме и патологии. М.: Медицинская книга; 2011. 287 с.
7. Акмаев Э.Г., Александров А.С., Алчинова И.Б., Бочаров Е.В., Карганов М.Ю., Крыжановский Г.Н., Кучеряну В.Г., Магаева С.В., Морозов С.Г., Носкин Л.А., Панфилов Д.Н., Пшенникова М.Г., Сарманаев С.Х., Сепиашвили Р.И., Сюч Н.И., Фисун А.Я., Чувин Б.Т. Санология / Под ред.: А.А. Кубатиева, В.Б. Симоненко. М.: Наука, 2014. 285 с.

### References

1. Bates M., Lachoff J., Meech D., Zulkower V., Moisy A., Luo Y., Tekotte H., Franziska Scheitz C.J., Khilari R., Mazzoldi F., Chandran D., Groban E. Genetic Constructor: An Online DNA Design Platform. *ACS Synth Biol.* 2017; 6(12): 2362-2365. DOI: 10.1021/acssynbio.7b00236
2. Kirchmaier S., Lust K., Wittbrodt J. Golden GATEway cloning – a combinatorial approach to generate fusion and recombination constructs. *PLoS One.* 2013; 8(10): e76117. DOI: [10.1371/journal.pone.0076117]

- 
3. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. [*Methods of genetic engineering. Molecular cloning*]. M.: Mir, 1984. 479 p. (in Russian)
  4. Rosano G.L., Ceccarelli E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol.* 2014; 5: 172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172
  5. [*Actual problems of neuroimmunopathology*] / Edited by G.N. Kryzhanovsky, S.V. Magaeva, S.G. Morozov. M.: Genius Media; 2012. 424 p. (in Russian)
  6. Kryzhanovsky G.N., Akmaev I.G., Magaeva S.V., Morozov S.G. [*Neuroimmune-endocrine interactions in health and disease*]. - M.: Medicinskaya kniga; 2011. 287 p. (in Russian)
  7. Akmaev E.G., Aleksandrov A.S., Alchinova I.B., Bocharov E.V., Karganov M.Yu., Kryzhanovskij G.N., Kucheryanu V.G., Magaeva S.V., Morozov S.G., Noskin L.A., Panfilov D.N., Pshennikova M.G., Sarmanaev S.H., Sepiashvili R.I., Syuch N.I., Fisun A.YA., CHuvin B.T. [*Sanologiya*] / Ed. A.A. Kubatiev, V.D. Simonenko. M.: Nauka, 2014, 285 p. (in Russian)

### **Сведения об авторах:**

*Нурбеков Малик Кубанычбекович – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции репаративных процессов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»*

*Терёхина Ольга Леонидовна – научный сотрудник лаборатории регуляции репаративных процессов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»*

*Дмитренко Ольга Павловна – заведующая диспансерным фтизиатрическим отделением Филиала по Зеленоградскому административному округу Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»*

*Лобанов Александр Владимирович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории общей и перинатальной нейроиммунопатологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт патологии и патофизиологии»; научный сотрудник лаборатории биологических испытаний Филиала федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» Российской академии наук*

*Лобанова Наталья Николаевна – ведущий специалист ООО «Церера»*