Новый способ получения функционально-активной термофильной пролидазы из археи THERMOCOCCUS SIBIRICUS в системе экспрессии ESCHERICHIA COLI.

Эльцина А. А., Горбачева М. А., Фатеева Т. В., Липкин А. В., Ракитина Т. В.

Московский физико — технический институт (Государственный университет), Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт", Институт биоорганической химии РАН

Пролинспецифическая дипептидаза или пролидаза – фермент, гидролизующий дипептиды, в которых пролин находится в С-концевой позиции. Пролидазы участвуют в катаболизме пролин-содержащих белков и пептидов, а также в рециклинге аминокислот, и соответственно имеют биотехнологическое и медицинское значение. Субстратами пролидаз могут быть также токсические фосфо-органические соединения, входящие в состав нервно-паралитических газов и пестицидов. В связи с этим активно исследуются возможности использования пролидаз в качестве биосенсоров, средств биодеконтаминации или компонентов антидотов [1].

Для более полного использования биотехнологического потенциала пролидаз необходимо комбинировать две стратегии: во первых, изучать новые ферменты, во вторых, направленно оптимизировать свойства природных ферментов согласно требованиям технологического процесса. Особый интерес в этом плане представляют пролидазы из экстремофильных микроорганизмов, так как они обладают широким спектром уникальных свойств, а именно способны работать в экстремальных условиях: повышенная температура, кислый или щелочной pH, высокая ионная сила, присутствие высоких концентраций детергентов. Поэтому для поиска генов, кодирующих новые пролидазы выбран геном гипертермофильной археи Thermococcus Sibiricus MM739, обитающей в гидротермальных источниках и подземных нефтяных резервуарах Западной Сибири при температуре от 40°C до 88°C. Анализ расшифрованного генома T. Sibiricus показывает наличие в нём гена TSIB_0821 (GenBank accession number ACS89882.1), кодирующего белок похожий на ранее изученную термофильную протеазу из Pyrococcus horikoshii OT3 (52 % гомологии).

Ранее в НИЦ «Курчатовский институт» гипотетическую пролидаза TSIB_0821 гипертермофильной археи Thermococcus Sibiricus была экспрессирована в системе E. Coli в виде рекомбинантного белка слитого на N-конце с последовательностью MRGSHHHHHHGS [2]. Однако, как показали структурные исследования продукта экспрессии, N-концевой пептид препятствовал формированию нативной укладки белка, что делало рекомбинантную пролидазу TSIB_0821 непригодной для использования в биотехнологических процессах.

Цель данной работы состояла в разработка простого и экологически чистого способа получения функционально-активной рекомбинантной пролидазы TSIB_0821, максимально приближенной по структуре к её природному аналогу.

Для решения данной задачи была сконструирована рекомбинантная плазмида pHisTevTSIB0821, включающая NdeI/SalI-фрагмент плазмиды pET-22b (Novagen) и фрагмент ДНК, размером 1196 пар оснований, содержащий слитый ген, состоящий из следующих структурных элементов: нуклеотидная последовательность, кодирующая шести гистидиновый таг, нуклеотидная последовательность, кодирующая сайт узнавания/расщепления протеазы TEV, и нуклеотидная последовательность гена TSIB_0821, соединённых так, чтобы при их биосинтезе в клетках E. coli, сохранялась непрерывная рамка считывания. Далее был получен штамм E. coli Rosetta(DE3), трансформированный указанной плазмидой, - продуцент химерного белка, включающего аминокислотную последовательность пролидазы TSIB_0821 слитую на N-конце с шести гистидиновым тагом и сайтом узнавания/расщепления протеазы TEV, и разработан способ выращивания и индукции штамма-продуцента, а также метод выделения и очистки из полученной биомассы функционально-активной рекомбинантной пролидазы TSIB_0821, включающий следующие технологические процессы: две металлоафинные хроматографии, гельфильтрацию, обработку TEV протеазой, диализ, концентрирование.

Описанный способ позволял получать рекомбинантную пролидазу TSIB_0821 максимально приближенную по структуре к её природному аналогу с высоким и стабильным выходом, уровнем очистки и функциональной активности.

1. R. Semcer and A. Grunden. (2012) J. Appl. Microbiol.
2. Trofimov, A. A., Slutskaya, E. A., Polyakov, K. M., Dorovatovskiic, P. V., Gumerov, V. M., Popov, V. O. (2012) Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.