

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 пролидазу 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 разработке 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 плаزمиды 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., Dorovatovskii, P. V., Gumerov, V. M., Popov, V. O. (2012) Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.