

Клонирование и бактериальная экспрессия цитокинподобного некаталитического домена бычьей тирозил-тРНК синтетазы

А. Л. Дубровский, Л. А. Савинская, А. И. Корнелюк

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

В бактериальной системе экспрессии в векторе pET15b клонирован и экспрессирован цитокинподобный С-концевой некаталитический домен тирозил-тРНК синтетазы быка (D322-S528). С использованием металл-хелатирующей хроматографии на Ni-NTA агарозе выделен рекомбинантный белок в гомогенном состоянии по данным гель-электрофореза.

Характерной особенностью аминоксил-тРНК синтетаз (АРСаз) является их модульная организация [1, 2]. Кроме каталитического домена, АРСазы, как правило, имеют дополнительные домены, придающие им специфичность в узнавании тРНК [1]. АРСазы высших эукариот отличаются от их прокариотических аналогов наличием дополнительных N- или С-концевых фрагментов, необходимых для полианионсвязывающих свойств или участия в формировании кодосом [2, 3].

Полипептид тирозил-тРНК синтетазы (КФ 6.1.1.1) из печени быка с молекулярной массой 59 кДа [4] содержит С-концевой некаталитический домен размером около 20 кДа, вносящий существенный вклад в родство синтетазы к высокомолекулярным РНК [5]. Проведенное клонирование и секвенирование кДНК, кодирующей тирозил-тРНК синтетазу быка [6, 7], показало, что С-домен имеет наиболее высокий уровень гомологии (63 %) с предполагаемым цитокином, белком ЕМАР II [8—10], а также с некаталитическими С-доменом метионил-тРНК синтетазы [11] и N-доменом β -субъединицы фенилаланил-тРНК синтетазы [12]. Недавно обнаружено, что полипептидом — предшественником данного цитокина является белок р43, компонент кодосомы — высокомолекулярного комплекса АРСаз [13].

Для изучения свойств изолированного цитокинподобного домена тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих в данной работе клонирована соответствующая кДНК, осуществлена бактериальная экспрессия и выделен рекомбинантный белок.

В работе использовали клетки *Escherichia coli*, штамм BL21 (DE3), вектор для клонирования *pK18* и плазмидный вектор для бактериальной экспрессии *pET15b* («Novagen», США). Конструкцию, экспрессирующую рекомбинантный белок, собирали на основе вектора *pET15b* и плазмид *pOL22* и *pC322* (любезно предоставлены О. И. Леванец и М. И. Вудмаской).

Плаزمид *pOL22* представляет собой клон, полученный в результате скрининга клонотеки печени быка, содержащий вставку кДНК тирозил-тРНК синтетазы по *EcoRI* сайту в плазмиде *pBlueScriptI*. Участок кДНК кодирует последовательность аминокислот тирозил-тРНК синтетазы G168-M511 [6]. Плазмид *p322* содержит последовательность кДНК тирозил-тРНК синтетазы, кодирующую С-концевую часть белка K412-S528, и протяженный участок 3'-нетранслируемой области [15]. Последовательности *pC322* и *pOL22* содержат область взаимного перекрывания длиной 299 п. н., содержащую уникальный сайт *XbaI*.

Фрагменты *BamHI-XbaI* размером 400 п. н. из *pOL22* и *XbaI-EcoRI* из *p322* размером 896 п. н. были одновременно лигированы в *pK18*, рестрицированную по *BamHI*- и *EcoRI*-уникальным сайтам

полилинкера (рис. 1). Полученная конструкция, обозначенная *pKCTD*, несет вставку кДНК бычьей тирозил-тРНК синтазы размером 1296 п. н., содержащую кодирующую последовательность (D322-S528) и 3'-нетранслируемую область. 3'-нетранслируемая область кДНК бычьей тирозил-тРНК синтазы содержит *Bam*HI-сайт. *Bam*HI-фрагмент из *pKCTD* размером 767 п. н. клонирован

по *Bam*HI-сайту в полилинкер плазмиды *pET15b* (рис. 1). Клоны, содержащие вставку в нужной ориентации, отобраны рестрикционным картированием по *Eco*RV-сайту, присутствие специфической вставки было также подтверждено методом ПЦР. Полученная конструкция была обозначена, как *pEYCD2*.

Плазмидой *pEYCD2* трансформировали клетки

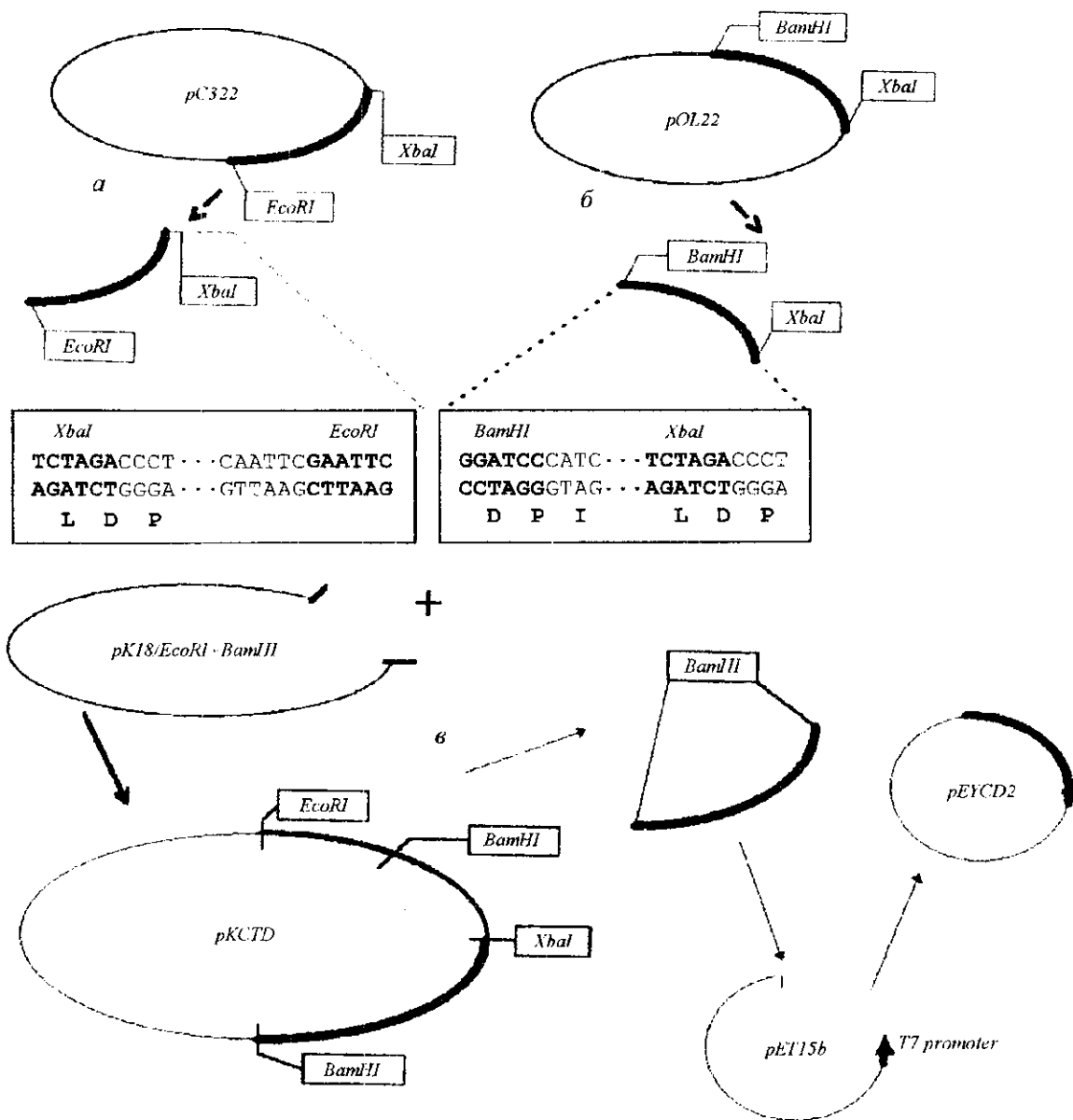


Рис. 1. Схема сборки плазмиды *pEYCD2*. Сборка *pKCTD*: фрагмент *Bam*HI-*Xba*I (400 п. н.) из *pOL22* (а) и фрагмент *Xba*I-*Eco*RI из клона 322 (896 п. н.) (б) одновременно лигированы в *pK18* по *Bam*HI- и *Eco*RI-уникальным сайтам полилинкера. Сборка *pEYCD2*: фрагмент *Bam*HI из *pKCTD* (767 п. н.) (в) лигирован по *Bam*HI-сайту в полилинкер плазмиды *pET15b*

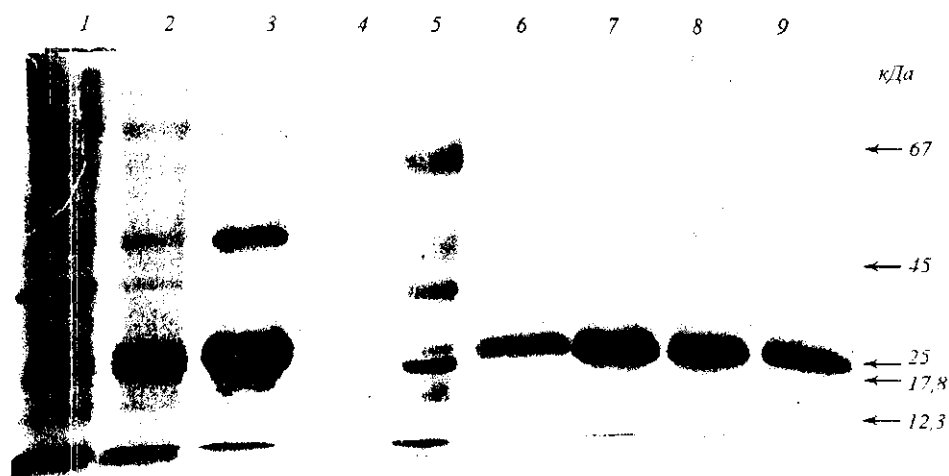


Рис. 2. Гель-электрофорез фракций белка после хроматографии на Ni-NTA агарозе суммарного лизата клеток *E. coli*, экспрессирующих YCD2: 1 — фракция белков, не связавшихся с носителем; 2 — промывка колонки при pH 8,0, денатурирующие условия; 3 — то же при pH 6,3; 4 — то же при pH 8,0, нативные условия после ренатурации; 5 — маркерные белки; 6 — 9 — фракции элюции целевого белка имидазолом

E. coli, штамм BL21 (DE3). Единичную колонию инокулировали в 2 мл среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и культивировали ночь при 37 °C и 120 об/мин на термостатируемой установке УВМТ-12-250. 100 мл среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, инокулировали 2 мл ночной культуры, полученной, как описано выше, и культивировали затем на термостатируемой установке при 37 °C и 160 об/мин до достижения оптической плотности $OD_{600} = 0,9-0,95$. Затем в среду для роста добавляли 100 мкл ампициллина в концентрации 100 мкг/мкл и 100 мМ IPTG до конечной концентрации 2 мМ и культивировали культуру клеток еще в течение 5 ч, бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 3500 об/мин на протяжении 15 мин.

Рекомбинантный белок YCD2 представляет собой полипептид длиной 231 аминокислотный остаток, содержащий 207 С-концевых аминокислот бычьей тирозил-тРНК синтазы (D322-S528) и N-концевую последовательность, кодируемую вектором и содержащую гексагистидиновую последовательность, необходимую для его выделения.

Рекомбинантный белок очищали при помощи аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе («Qiagen», США). Замороженный бактериальный осадок размораживали и лизировали при комнатной температуре в буфере для нанесения (0,1 М Na_2HPO_4 ; 20 мМ трис-НСl, pH 8,0, 8 М мочевины). Лизат осветляли центрифугированием при 10000 g (15 мин) и 4 °C, наносили на колонку объемом 1 мл при комнатной температуре. Далее для ренатурации связанных белков колонку промывали бу-

фером для нанесения с градиентным снижением концентрации мочевины от 8 до 0 М в присутствии 0,1 % β -меркаптоэтанола. Колонку промывали 3 мл буфера для нанесения без мочевины.

Рекомбинантный белок элюировали 3 мл элюирующего буфера (0,5 М NaCl, 20 мМ трис-НСl, pH 7,8, 0,3 М имидазол). Полученный белок характеризовали методом гель-электрофореза по Леммли [14], концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда [15].

Данные гель-электрофореза (рис. 2) показали, что рекомбинантный белок, содержащий С-домен тирозил-тРНК синтазы, является гомогенным.

Для характеристики нативности третичной структуры данного белка были измерены спектры триптофановой флуоресценции белка в растворе. Обнаружено, что положение максимума спектра флуоресценции белка смещено в коротковолновую область (327 нм) по сравнению со свободным триптофаном (352—355 нм), что соответствует полностью экранированному положению остатка триптофана W505 в белковой глобуле.

О. Л. Дубровський, Л. О. Савинська, О. І Корнелюк

Клоування і бактеріальна експресія цитокіноподібного некаталітичного домена тирозил-тРНК синтази біка

Резюме

В бактеріальній системі експресії у векторі pET15b клонований та експресовано цитокіноподібний С-кінцевий некаталітичний домен тирозил-тРНК синтази біка (D322-S528). З використанням метал-хелатуючої хроматографії на Ni-NTA-агарози виділено рекомбінантний білок у гомогенному стані за даними гель-електрофорезу.

A. L. Dubrovsky, L. A. Savinskaya, A. I. Kornelyuk

Cloning and bacterial expression of the cytokine-like noncatalytic domain of bovine tyrosyl-tRNA synthetase

Summary

Cytokine-like noncatalytical C-terminal domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase (D322-S528) has been cloned and expressed in bacterial expression system using pET15b vector. Recombinant protein has been isolated by metal-chelating chromatography on the Ni-NTA agarose into a homogenous state according to gel-electrophoresis data.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jasin M., Regan L., Schimmel P. Dispensable pieces of an aminoacyl-tRNA synthetase which activate the catalytic site // *Cell*.—1984.—36.—P. 1089—1095.
2. Mirande M. Aminoacyl-tRNA synthetase family from prokaryotes and eukaryotes. Structural domains and their implications // *Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.*—1991.—40.—P. 95—142.
3. Cirakoglu B., Waller J.-P. Do yeast aminoacyl-tRNA synthetases exist as «soluble» enzymes within the cytoplasm? // *Eur. J. Biochem.*—1985.—149.—P. 353—361.
4. Корнелюк А. И., Курочкин И. В., Мацука Г. Х. Тирозил-тРНК синтетаза из печени быка. Выделение и физико-химические свойства. // *Молекуляр. биология*.—1988.—22, № 1.—С. 176—186.
5. Курочкин И. В., Корнелюк А. И., Мацука Г. Х. Взаимодействие эукариотической тирозил-тРНК-синтетазы с высокомолекулярными РНК // Там же.—1991.—25, № 3.—С. 779—786.
6. Леванец О. В., Найденов В. Г., Вудмаска М. И. и др. Клонирование кДНК, кодирующей С-концевую часть тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих, с использованием ПЦР-амплифицированного радиоактивно меченного гиб-

- рилизационного зона // *Биополимеры и клетка*.—1997.—13, № 2.—С. 121—126.
7. Леванец О. В., Найденов В. Г., Одынец К. А. и др. Гомология С-концевого некаталитического домена тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих с цитокином ЕМАР II и некаталитическими доменами метионил- и фенилаланил-тРНК синтетаз // Там же.—№ 6.—С. 474—478.
8. Kao J., Ryan J., Brett G. et al. Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms // *J. Biol. Chem.*—1992.—267.—P. 20239—20247.
9. Kao J., Houck K., Fan Y. et al. Characterization of a novel tumor-derived cytokine. Endothelial-monocyte activating polypeptide II // *Ibid.*—1994.—269.—P. 25106—25119.
10. Tas M. P., Murray J. C. Endothelial-monocyte-activating polypeptide II // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*—1996.—28.—P. 837—841.
11. Dardel F., Fayat G., Blanquet S. Molecular cloning and primary structure of the *Escherichia coli* methionyl-tRNA synthetase gene // *J. Bacteriol.*—1984.—160.—P. 1115—1122.
12. Mechulam Y., Fayat G., Blanquet S. Sequence of the *Escherichia coli* pheST operon and identification of the himA //
13. Quevillon S., Agou F., Robinson J.-C., Mirande M. The p43 component of the mammalian multi-synthetase complex is likely to be the precursor of the endothelial monocyte-activating polypeptide II cytokine // *J. Biol. Chem.*—1997.—272.—P. 32573—32579.
14. Leamml U. K. Cleavage proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*.—1970.—227.—P. 680—685.
15. Bredford M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // *Analyt. Biochem.*—1976.—72.—P. 248—254.

Поступила в редакцию 25.05.98