

КЛОНИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Гоптарь И.А., Рыкалина В.Н., Судьина А.Е., Маркелов М.Л., Кузницова С.В., Зацепин Т.С., Шипулин Г.А.

ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Для молекулярной диагностики помимо наиболее известных ферментов и методик, таких как Taq ДНК полимеразы и ПЦР, часто возникает необходимость использовать и другие менее распространенные ферменты и методики.

В качестве одной из альтернативы ПЦР, в основе которой лежит принцип удвоения ДНК матрицы, применяют методику изотермической амплификации – NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) [1]. В реакции NASBA используются три фермента – обратная транскриптаза, рибонуклеаза H и ДНК-зависимая РНК полимеразы. Основным конечным продуктом реакции является специфическая РНК гомологичная исходной матрице. При диагностике инфекционных заболеваний данная методика имеет ряд преимуществ по сравнению с ПЦР. Во-первых, использование в качестве исходной мишени рибосомальной РНК обеспечивает высокую концентрацию матриц для амплификации, поскольку количество копий рибосомальной РНК в живой клетке может достигать нескольких тысяч. Во-вторых, РНК гораздо менее стабильна по сравнению с ДНК, и результаты диагностики на основе NASBA могут более адекватно отображать эффективность проводимой антибактериальной терапии.

При использовании в качестве матрицы молекул РНК, например, для синтеза кДНК, ОТ-ПЦР, транскрипции *in vitro*, следует учитывать нестабильность РНК, которая может деградировать под действием РНКаз, вносимых извне в реакционную среду. Для уменьшения деградации РНК можно использовать плацентарный ингибитор РНКаз (PRI, placental ribonuclease inhibitor) – высокоэффективный ингибитор, добавление которого к препарату РНК значительно увеличивает его стабильность.

Важной частью молекулярной диагностики является определение первичной последовательности ДНК с помощью секвенирования. При проведении данной процедуры одним из главных этапов является пробоподготовка – очистка продуктов ПЦР. Наиболее простой и удобный способ очистки – обработка ампликонов смесью двух ферментов

эксонуклеазой I и щелочной фосфатазой для удаления неизрасходованных в ходе ПЦР праймеров и дезоксинуклеотидтрифосфатов.

Одним из важнейших условий эффективной работы диагностической ПЦР-лаборатории является соблюдение режима предотвращения контаминации реагентов продуктами амплификации. Существенную помощь в борьбе с контаминацией оказывает модификация ПЦР, при которой в реакционной смеси часть тимидинтрифосфатов (ТТР) заменяется на уридинтрифосфаты (УТР). Таким образом, все синтезированные ампликоны содержат урацил и легко удаляются под действием урацил-ДНК-гликозилазы. Обработка данным ферментом ДНК матрицы и других компонентов реакционной смеси, приводит к снижению наблюдаемого уровня контаминации. Следует отметить, что для использования в молекулярной диагностике урацил-ДНК-гликозилаза должна быть термолабильной, т.е. необратимо терять активность после инкубации при повышенной температуре.

Целью нашей работы являлось получение препаратов рекомбинантных ферментов: РНКазы *Escherichia coli*, ДНК-зависимой РНК полимеразы бактериофага Т7, эксонуклеазы I *Escherichia coli*, щелочной фосфатазы *Alteromonas macleodii*, урацил-ДНК-гликозилазы *Gadua morhua*, обратной транскриптазы вируса миелобластоза птиц (Avian Myeloblastosis Virus, AMV), ингибитора PRI, а также разработка методик определения их функциональной активности с помощью флуоресцентных зондов.

Для получения гена PRI была использована суммарная РНК из лимфоцитов человека, на основе которой была получена кДНК. После чего с помощью ПЦР и специфических олигонуклеотидных праймеров были наработаны фрагменты гена PRI, лигированы *in vitro*, клонированы в рGEM, а затем в вектор для экспрессии в *E. coli*. Ингибитор экспрессировали в виде химеры с фрагментом теоредоксина для повышения растворимости белка. Между функциональным и вспомогательным доменами были сделаны 3 варианта вставок: AlaSer, GlySer и GlySerGlySerGlySer. Во всех случаях была обнаружена экспрессия целевого белка в растворимой форме. Для оценки эффективности ингибирования РНКазы А полученными препаратами ингибитора был использован флуоресцентный РНК зонд:

FAM-UAG CGU UAA CCG GUA CGC-BlackHole.

Все полученные препараты ингибитора в концентрации 10^{-7} М в зависимости от структуры вставки эффективно подавляли активность РНКазы А в концентрации 10^{-9} М.

Вектор для экспрессии Т7 РНК полимеразы был сконструирован на основе вектора рAR 1219 [2] посредством введения в него фрагмента полигистидина для более легкой и эффективной очистки получае-

мой полимеразы. Для оценки активности выделенной T7 РНК полимеразы в реакционную смесь вносили 2 комплементарных друг другу зонда, один из которых содержал на 3'-конце флуорофор, а другой на 5'-конце тушитель, таким образом, при отжиге зондов друг на друга флуоресценции не наблюдалось. Помимо зондов в реакционную смесь вносили субстрат для T7 РНК полимеразы – олигонуклеотид длиной около 70 нуклеотидов, содержащий в своей последовательности T7 промотор. Структура субстрата была подобрана так, что один из зондов отжигался на синтезированном РНК полимеразой олигонуклеотиде, приводя к возрастанию уровня флуоресценции. Используя данную методику было показано, что подобранные нами условия экспрессии и очистки позволяют получить препарат T7 РНК полимеразы, обладающий удельной ферментативной активностью выше импортных аналогов.

Для получения суперпродуктов рекомбинантных ферментов РНКазы H и экзонуклеазы I из *E. coli* была выделена ДНК, на основе которой с помощью специфических праймеров были амплифицированы и клонированы гены, кодирующие соответствующие белки. После двухстадийной очистки с использованием аффинной и высокоэффективной хроматографий активность полученной РНКазы H была оценена с использованием выше упомянутого РНК зонда и комплементарного ему ДНК олигонуклеотида. Суть метода заключается в деградации комплекса РНК зонд/ДНК олигонуклеотид под действием РНКазы H, при этом происходит возрастание флуоресценции и изменение кривых плавления олигонуклеотидов реакционных смесей.

Для определения активности экзонуклеазы I использовали олигонуклеотидный зонд с тушителем флуоресценции на 5'-конце, который обрабатывали препаратом фермента, а после остановки реакции в реакционную смесь вносили зонд с флуорофором на 3'-конце и по уровню наблюдаемой флуоресценции оценивали активность экзонуклеазы I. Было показано, что полученные препараты ферментов РНКазы H и экзонуклеазы I показывают уровень удельной активности, соответствующий литературным данным.

Используя известные последовательности генов щелочных фосфатаз родственных микроорганизмов, был проведен поиск гена щелочной фосфатазы в полностью секвенированном геноме *A. taeniodii* – микроорганизме, живущем при пониженных температурах, что предполагает термоллабильность ферментов, обеспечивающих его жизнедеятельность. Структура выбранного гена была оптимизирована для экспрессии в *E. coli*. Данный ген был собран с помощью набора олигонуклеотидов с использованием стандартных генно-инженерных методов. Активность очищенного рекомбинантного препарата

определялась спектрофотометрически с использованием в качестве субстрата р-нитрофенилфосфата. Было показано, что исследуемый препарат обладает высокой фосфатазной активностью и является термолabileм.

Аналогичным образом последовательность гена урацил-ДНК-гликозилазы из *G. morhua* была оптимизирована для эффективной экспрессии в *E. coli* и была собрана *in vitro* из набора синтетических олигонуклеотидов. Для определения уровня активности данного фермента был создан флуоресцентный ДНК зонд длиной 18 нуклеотидов, содержащий в своей структуре урацил, а также флуорофор и тушитель. При наличии в реакционной смеси урацил-ДНК-гликозилазы происходит деградация зонда после кратковременного прогревания до 94°C и увеличение уровня флуоресценции. Полученный в нашей лаборатории препарат обладает высокой активностью, а также является термолabileм, что подтверждено экспериментально.

Ген AMV обратной транскриптазы, состоящей из двух субъединиц, был собран *in vitro* из набора синтетических олигонуклеотидов. Затем последовательности, кодирующие обе субъединицы, были клонированы в плазмиду, сконструированную в нашей лаборатории для совместной экспрессии двух белков. Удалось подобрать условия для эффективной экспрессии фермента в активной форме, что было показано с помощью набора АмплиСенс HCV-Монитор-FRT (производства ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии») для количественного определения РНК вируса гепатита С (HCV) в клиническом материале, используя вместо ТМ-ревертазы, входящей в набор, очищенный препарат AMV обратной транскриптазы.

Таким образом, в нашей лаборатории был получен ряд ферментов, активность которых была подтверждена с помощью различных методов без использования радиоактивных изотопов.

Литература.

1. Kievits T., Van Gemen B., Van Strijp D., Schukkink R., Dircks M., Adriaanse H., Malek L., Sooknanan R., Lens P. NASBA(TM) isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *Journal of Virological Methods*, 1991, 35, 273-286.

2. Davanloo P., Rosenberg A.H., Dunn J.J., Studier F.W. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc.Natl. Acad.Sci.USA*, 1984,81,2035-2039.