



УДК 577.218

СИНТЕЗ В КЛЕТКАХ *Escherichia coli* И БЫСТРЫЙ МЕТОД ОЧИСТКИ ВЫСОКОАКТИВНОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ His₆-ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *Thermus aquaticus*

© 1995 г. Ю. В. Смирнов, А. Ф. Фрадков, О. Г. Чахмахчева, В. А. Ефимов*

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступило в редакцию 10.11.94 г.

Ключевые слова: полимеразы *Taq*, полимеразная цепная реакция, хроматография металл-хелатная.

Термостабильная ДНК-полимераза *Thermus aquaticus* (*Taq*-полимераза) в настоящее время является необходимым инструментом в работах, связанных с амплификацией фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В связи с этим не ослабевают интерес к совершенствованию методов получения этого фермента в высокоочищенном виде [1 - 3]. В настоящей работе описано клонирование гена *Taq*-полимеразы, его экспрессия в *E. coli* с получением гибридного белка с полигистидиновым доменом и выделение высокоактивного препарата рекомбинантного фермента с помощью аффинной хроматографии.

Ген *Taq*-полимеразы (2496 п. о.) собирали из трех фрагментов, полученных методом ПЦР с использованием ДНК *Th. aquaticus* [1] и шести синтетических олигонуклеотидов-праймеров (см. схему). Последовательности двух из них соответствовали 5'- и 3'-концам целевого гена (праймеры 1 и 4) и имели сайты эндонуклеаз рестрикции *Bgl*III и *Eco*RI для встраивания гена в экспрессирующий вектор. Фрагменты I, II и III гена *Taq*-полимеразы длиной соответственно 627, 1012 и 915 п. о. были получены в трех отдельных ПЦР в условиях, аналогичных описанным в работе [2]. Продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза в 1.5% агарозном геле. Фрагмент I обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *Hind*III, фрагмент II - *Hind*III и *Pst*I, а фрагмент III - *Pst*I. Полученные при этом дуплексы лигировали последовательно: сначала фрагменты I и II, а затем к полученному при этом дуплексу длиной 1602 п. о. присоединяли фрагмент III. Продукт лигирования, соответствующий целому гену (2505 п. о.), обрабатывали рестриктазами *Bgl*III и *Eco*RI и встраивали в предварительно расщепленную эти-

ми же ферментами плазмиду рТН1, сконструированную нами ранее [4]. В экспрессирующем векторе рТН1 условия транскрипции гена целевого полипептида создаются за счет промоторной области гена 10 бактериофага Т7, а условия трансляции - за счет предшествующего этому гену рибосомсвязывающего участка и стартового триплета, за которым следуют фрагмент, кодирующий гомогистидиновый домен, и полилинкерный участок. Введение гена в плазмиду рТН1 между *Bgl*III- и *Eco*RI-сайтами обеспечивает сохранение рамки считывания, а продукт его экспрессии содержит на N-конце 11 дополнительных аминокислотных остатков, шесть из которых представляют собой гистидин. Наличие последних должно обеспечивать возможность очистки рекомбинантного белка металл-аффинной хроматографией на Ni-агарозе.

В результате введения гена *Taq*-полимеразы в вектор рТН1 была получена плазида рТН1. После трансформации клеток *E. coli* BL21(DE3) этой ДНК проводили скрининг колоний гибридизацией с мечеными фрагментами гена *Taq*-полимеразы, а затем давшие положительный сигнал клоны проверяли на наличие *Taq*-полимеразной активности [5]. Клоны, обнаружившие наивысшую активность, использовали для получения биомассы для препаративного выделения фермента.

Выращивание биомассы и лизис клеток проводили в основном так, как описано в работе [2]. После инкубации грубого лизата при 75°C в течение 30 мин и последующего центрифугирования (12000 об/мин, 15 мин, 4°C) супернатант наносили на колонку с Ni-NTA-агарозой (фирма QIAGEN, ФРГ), предварительно промытой буфером, содержащим 10 мМ трис-НСl (рН 7.9), 300 мМ КСl, 0.1% Nonidet P40, и уравновешенной тем же буфером с добавлением 1 мМ EDTA и 1 мМ фенол-

* Автор для переписки.

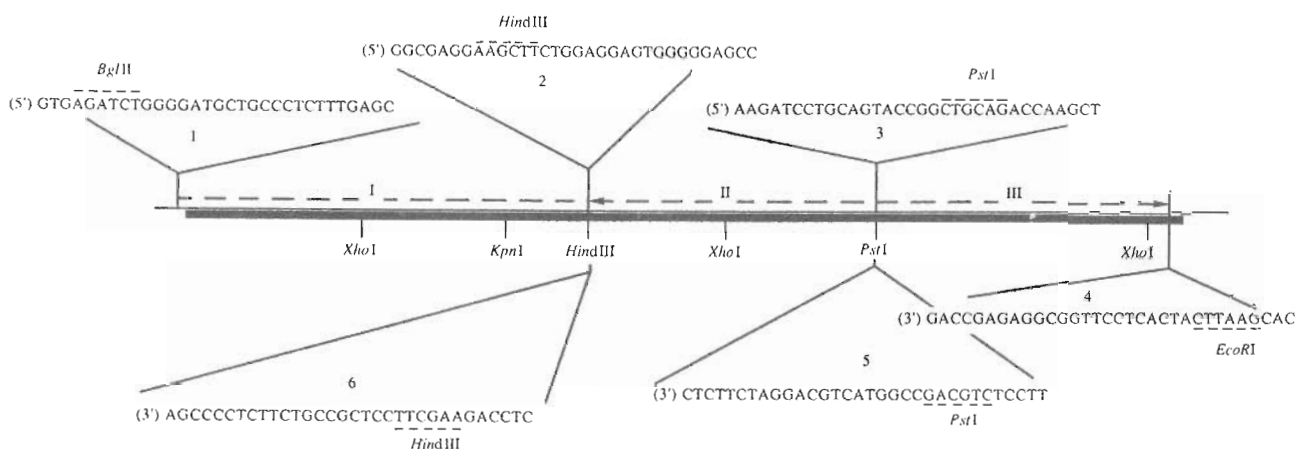
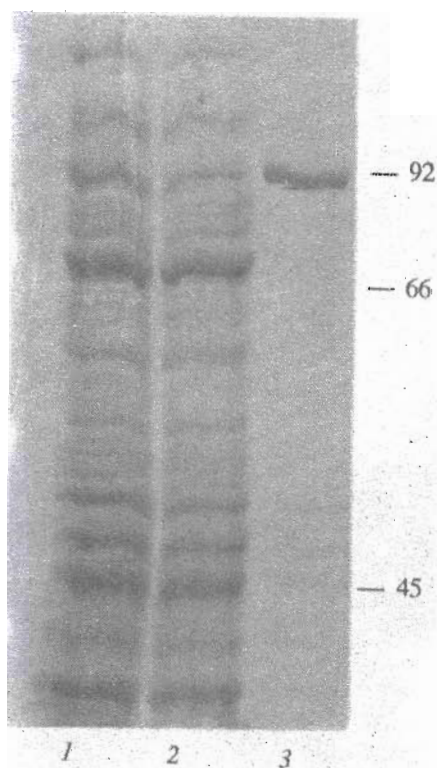


Схема.

метилсульфонилфторида (PMSF). После нанесения лизата сорбент промывали буфером, содержащим 20 мМ HEPES (pH 7.9), 300 мМ KCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ PMSF, 0.1% Nonidet P40. Затем *Taq*-полимеразу элюировали тем же буфером с добавлением

200 мМ имидазола и концентрировали диализом против буфера, содержащего 20 мМ HEPES (pH 7.9), 100 мМ KCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 0.1% Nonidet P40, 50% глицерина. В результате подобной очистки из 1 л бактериальной культуры был получен практически гомогенный препарат фермента (см. рисунок) в количестве 0.8 - 1 мг с удельной активностью около 6.5 тыс. ед. акт./мг белка. Активность *His₆-Taq*-полимеразы определяли так, как описано в работе [5].



Электрофорез в 10% полиакриламидном геле с SDS белковых фракций при выделении рекомбинантной *His₆-Taq*-полимеразы из клеток *E. coli* BL21 (DE3) pTNT1: 1 – суммарный клеточный лизат; 2 – фракция белков, не связавшихся с Ni-NTA-агарозой; 3 – гибридный белок после элюции с Ni-NTA-агарозы, обладающий высокой *Taq*-полимеразной активностью; справа указаны молекулярные массы (кДа).

Очищенные препараты рекомбинантной *His₆-Taq*-полимеразы обладали хорошей процессивностью и эффективно амплифицировали в ПЦР фрагменты ДНК длиной более 2500 - 3000 п. о. Фермент сохранял до 50% полимеразной активности после инкубации в течение 60 мин при 95°C. *His₆-Taq*-полимераза сохраняла активность на протяжении 30 - 40 циклов ПЦР. Как показало тестирование в условиях работы [6], выделенный нами рекомбинантный фермент был практически свободен от нежелательных примесей белковой природы, в том числе белков, обладающих эндонуклеазной и 3'-5'-экзонуклеазной активностью. Полученные данные показывают, что введенные аминокислотные замены не ухудшили свойств термостабильной ДНК-полимеразы по сравнению с доступными коммерчески и известными из литературы препаратами фермента [1 - 3] и в то же время существенно облегчили его очистку, сократив ее до одной стадии. Это делает полученный нами штамм *E. coli* – продуцент *His₆-Taq*-полимеразы – весьма перспективным для биотехнологии.

Авторы признательны А.Л. Калинкиной и Н.С. Быстрову за синтез олигодезоксирибонуклеотидов, а также В.С. Артамоновой за участие на отдельных стадиях эксперимента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lawyer F.C., Stoffel S., Saiki R.K., Myambo K., Drummond R., Gelfand D.H.* // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 11. P. 6427 - 6437.
2. *Engelke A.C., Krikos A., Bruck M.E., Ginsburg D.* // Anal. Biochem. 1990. V. 191. № 2. P. 396 - 400.
3. *Патрушев Л.И., Валяев А.Г., Головченко П.А., Виноградов С.В., Чикиндас М.Л., Киселев В.И.* // Молекуляр. биология. 1993. Т. 27. № 5. С. 1100 - 1112.
4. *Ефимов В.А., Фрадков А.Ф., Калинин А.Л., Чахмахчева О.Г.* // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. № 1. С. 11 - 17.
5. *Каледин А.С., Слюсаренко А.Г., Городецкий С.И.* // Биохимия. 1980. Т. 45. № 4. С. 644 - 651.
6. *Каледин А.С., Слюсаренко А.Г., Городецкий С.И.* // Биохимия. 1982. Т. 47. № 11. С. 1785 - 1791.

**Synthesis in *Escherichia coli*
and a Rapid Method of Isolating High-activity
Recombinant His₆ DNA Polymerase
from *Thermus aquaticus***

Yu. V. Smirnov, A. F. Fradkov, O. G. Chakhmakhcheva, and V. A. Efimov*

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117871 Russia*

Key words: Taq polymerase, polymerase chain reaction, metal-chelate chromatography.

* To whom correspondence should be addressed.