

Ю.П. Буренкова, млад. науч. сотр.;
В.В. Щур, млад. науч. сотр.;
А.В. Янцевич, зав. лаб., канд. хим. наук
(ИБОХ НАН Беларуси, г. Минск)

ЭКСПРЕССИЯ ТЕРМИНАЛЬНОЙ ДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДИЛ ТРАНСФЕРАЗЫ В КЛЕТКАХ *E. COLI*

Основное свойство терминальной дезоксиинуклеотидил трансферазы (ТдТ) – способность создавать геномный материал *de novo*, включая случайные нуклеотиды в цепь [1]. Фермент открыт в 60-х годах прошлого века и остается одной из наименее изученных ДНК-полимераз. Это фермент, экспрессируемый в незрелых, пре-В, пре-Т лимфоцитах, а также при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ) [2].

ТдТ применяется при достраивании гомополимерных хвостов на 3'-концах ДНК; мечении 3'-конца ДНК модифицированными нуклеотидами (ddNTP, DIG-dUTP); в методе TUNEL (детекция апоптоза *in situ*); в ТдТ-зависимой ПЦР; при создании энзиматических методов *de novo* синтеза ДНК и библиотек синтетических генов [1, 3, 4].

В последние 2 года несколько биотехнологических компаний, анонсировали разработку энзиматического метода синтеза ДНК с использованием ТдТ. Это Ansa Biotechnologies (США), Molecular Assemblies (США), DNA Script (Франция), Nuclera Nucleics (Великобритания).

Цель данной работы – создание систем экспрессии ТдТ в клетках *E. coli*. Осуществлен синтез гена, пригодного для получения транскрибированных ТдТ и мутагенеза. Проведена оптимизация условий экспрессии белка.

Последовательность гена ТдТ *Bos taurus* (NP_803461, 1560 п.о.) оптимизирована для экспрессии в *E. coli*. Проектирование сборки велось в программе DNABWorks. Для сборки последовательность была разбита на олигонуклеотиды длиной 65 нуклеотидов, с температурой плавления перекрытий 72°C. Фосфорамидитным методом синтезировано 42 олигонуклеотида. Проведена ПЦР-сборка гена (термоциклер Терцик, ДНК-технологии) с клонированием в вектор pJET1.2 (ThermoScientific). Добавлены сайты рестрикции к 5'(NdeI) и 3'(HindIII) концам, 6His-метка на N-конец.

Проведено рестрикционное картирование векторов экспрессии pCW, pTrc99a, pET23a, pET20b. Оптимальными выбраны pCW и pET20b. Ген клонирован из промежуточного вектора в вектора экспрессии pCW и pET20b по сайтам Nde I и HindIII. Штамм *E. coli* DH5α

трансформировали полученными плазмидами, также штамм *E. coli* BL21 (DE2) трансформировали плазмидов рЕТ20b-TdT.

Секвенировали плазмиды на секвенаторе 3500xL Genetic Analyzer, AB.

Активность фермента проверяли после экспрессии рCW-TdT в клетках *E. coli* DH5α и рЕТ20b-TdT в *E. coli* BL21 (DE3). Индивидуальные колонии культивировали в LB среде, индуцировали синтез добавлением IPTG (1 мМ). Экспрессию проводили 13 часов при 20°C в LB-среде (для рCW) и 20 часов при 20°C в TB-среде (рCW и рЕТ20b). В обоих случаях фермент был очищен металло-хелатной хроматографией. Получен функционально активный фермент. Подтверждена структура фермента методами масс-спектрометрии MALDI-TOF (соответствие ожидаемой молекулярной массе и пептидное картирование триптического гидролизата). Пептиды были характеристичны для данного белка, удалось добиться покрытия 52% последовательности белка.

Затем проводили оптимизацию условий экспрессии в TB среде. Проводили сравнение для рCW-TdT в *E. coli* DH5α, рCW-TdT в *E. coli* BL21 (DE2) и рЕТ20b-TdT в *E. coli* BL21 (DE3). Индивидуальные колонии с рекомбинантной плазмидой культивировали в среде LB (содержащей 100 мкг/мл ампициллина) при 37°C и 220 об/мин, до оптической плотности D600=0,6. Индуцировали синтез добавлением IPTG (1 мМ). Экспрессию белка проводили 36 часов (с отбором части через 9, 16 и 24 часа) при 16 °C, 21°C и 26 °C и 180 об/мин. Лизис клеток проводили путем обработки ультразвуком (15 минут на ультразвуковой бане при 4-8°C). Белковый профиль детектировали с помощью ПААГ электрофореза.

При 16 °C за 36 часов не удалось добиться экспрессии белка в *E. coli* DH5α с рCW-TdT. Также установлено, что при 21°C и 26 °C *E. coli* DH5α с рCW-TdT экспрессирует меньшее количество белка, чем рCW-TdT и рЕТ20b-TdT в *E. coli* BL21 (DE3). При экспрессии при 36 °C достаточно 9-16 часов, при 20 °C – 16-24, при 16 °C – не менее 24 часов. Необходимо дальнейшее изучение для определения преимущественной системы экспрессии между рCW-TdT и рЕТ20b-TdT в *E. coli* BL21 (DE3).

В ходе работы получен ген ТдТ, оптимизированный для направленной инженерии фермента. Созданы вектора для гетерологической экспрессии ТдТ в клетках *E. coli*: рCW-TdT (tac-промотор, штаммы штаммов DH5α и BL21(DE3)) и рЕТ20b-TdT (T7-промотор, штамм BL21(DE3)). Определено, что экспрессия рCW-TdT в клетках *E. coli* штамма DH5α хоть и позволяет получить функционально активный

белок, не позволяет получить его в количестве, сравнимом с экспрессией в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3).

Направленная инженерия ТдТ позволит получать транскрибированные формы ТдТ, получать белки слияния с ДНК связывающими белками, изменять субстратную специфичность по отношению к модификациям 3'ОН группы. Получение стабильных форм ТдТ с измененной субстратной специфичностью – шаг к разработке метода направленного энзиматического *de novo* синтеза одноцепочечной ДНК в водных средах [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Loc'h, J. Terminal deoxynucleotidyltransferase: the story of an untemplated DNA polymerase capable of DNA bridging and templated synthesis across strands / J. Loc'h, M. Delarue // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2018. – Vol. 53 – P. 22–31.

2. Motea, E.A. Terminal deoxynucleotidyl transferase: the story of a misguided DNA polymerase / E.A. Motea, A.J. Berdis // *Biochim. Biophys. Acta BBA-Proteins Proteomics.* – 2010. – Vol. 1804, № 5. – P. 1151–1166.

3. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay using bench top flow cytometer for evaluation of sperm DNA fragmentation in fertility laboratories: protocol, reference values, and quality control / R. Sharma [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2016. – Vol. 33, № 2. – P. 291–300.

4. Terminator-free template-independent enzymatic DNA synthesis for digital information storage / H.H. Lee [et al.] // *Nat. Commun.* – 2019. – Vol. 10, № 1. – P. 2383.

5. De novo DNA synthesis using polymerase-nucleotide conjugates / S. Palluk [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2018. – Vol. 36, № 7. – P. 645-650.