

## Получение и применение человеческого ингибитора рибонуклеаз в бесклеточной системе транскрипции-трансляции.

Ткачук Артем Петрович<sup>1</sup>, Хаустов Сергей Анатольевич<sup>2</sup>

студент<sup>1</sup>, младший научный сотрудник<sup>2</sup>

Институт белка РАН<sup>1</sup>, Институт теоретической и экспериментальной биофизики  
РАН<sup>2</sup>, Россия, Пущино

[Art\\_protres@rambler.ru](mailto:Art_protres@rambler.ru)

Рибонуклеазы (РНказы) являются важнейшими ферментами клеточного метаболизма. Они влияют на экспрессию генов, рост и дифференцировку клеток, участвуют в защите клеток от патогенов и в индукции апоптоза. Ещё в 50-х годах прошлого столетия отмечали, что ткани млекопитающих содержат белковый ингибитор РНказ панкреатического типа, и в клетках РНказы находятся преимущественно в комплексе с этим ингибитором, который в связи с этим тоже участвует во всех указанных процессах. Использование ингибиторов РНказ связано с необходимостью блокировать их активности при работе с РНК-содержащими препаратами. В настоящее время задача создания эффективных ингибиторов РНказ в полной мере не решена, а актуальность этой проблемы возросла, когда стало ясно, что ингибиторы РНказ могут использоваться в терапии онкологических и аллергических болезней.[1] Наша работа посвящена получению активного человеческого ингибитора РНказ семейства панкреатической РНказы А (RI). При получении суперпродуцента этого белка в штаммах *E. coli* исследователи столкнулись с рядом проблем. Основной трудностью было то, что практически весь белок, синтезируемый бактериальной клеткой неактивен и находится в нерастворимой форме – образует «тела включения».

Ген рибонуклеазного ингибитора получен с помощью сочетания предложенных ранее схем [2] объединения олигонуклеотидов с помощью ПЦР. Так как ген является довольно сложным для использования метода объединения олигонуклеотидов, была применена схема синтеза отдельных фрагментов и их последующее объединение с помощью эндонуклеазы рестрикции II-с типа - *BbvII*. Благодаря примененному подходу удалось оптимизировать кодоновый состав гена для *E.coli*, снять проблему экзон-интронного состава гена RI. Полученный ген был клонирован в экспрессионный вектор с T7 промотором – pET 28b. Однако, весь синтезируемый в *E. coli* белок выпадает в «тела включения». Рефолдинг белка после воздействия денатурирующими агентами, различные условия культивирования, ко-экспрессия с шаперонами не дали желаемого результата. Полностью растворимый и активный RI удалось получить в бесклеточной системе транскрипции-трансляции на основе S30 экстракта *E.coli* в присутствии неионного детергента Brij 35 (0.5%) с активностью порядка 80000 ед./мл системы. Также показана возможность применения созданной генетической конструкции с геном RI в бесклеточной системе транскрипции-трансляции вместо белкового RI. В модельных экспериментах в качестве «целевого» белка для простоты детекции использовался GFP. В batch-варианте системы при продолжительности работы до 2-2,5 часов влияние RI на выход целевого белка не наблюдался. Однако в диализном варианте (SECF-система) добавление в реакционную смесь RI значительно увеличивает как продолжительность работы системы (до 12-15 часов), так и выход целевого белка. При добавлении в SECF-систему вместо белкового RI генетической конструкции, несущей ген RI, удалось добиться сравнимых с контролем выходов белка, а также увеличить время работы системы до 20-24 часов.

Литература:

1. Ингибиторы рибонуклеаз, Яковлев Г.И., Митькевич В. А., Макаров А. А.// Молекулярная биология, 2006, том 46, №6, с.962-970
2. Two-step total gene synthesis method, Lei Young and Qihan Dong//Nucleic Acids Research, 2004, Vol. 32, No. 7 e59