

УДК 615.277

КЛОНИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТОВ КДНК ГЕНА ТИРЕОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА*А.В. Зубков, А.А. Корноухова, Н.С. Кузьмина, А.В. Сидоров, Л.Г. Бутова, О.А. Свитич**ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия***Введение**

Тиреоглобулин человека (ТГ) – это гликопротеин с молекулярной массой 660 кДа, образующийся в фолликулярных клетках щитовидной железы и секретирующийся в просвет фолликула, где непосредственно участвует в синтезе гормонов щитовидной железы: тетрайодотиронина (Т4) и трийодотиронина (Т3). Синтез гормонов происходит при непосредственном участии пероксидазы щитовидной железы – фермента, расположенного на апикальной части тиреоцита и при непосредственном контакте с тиреоглобулином, формирующей гормоны Т4 и Т3. После отщепления от тиреоглобулина гормонов ЩЖ, гликопротеин подвергается расщеплению и эндоцитозу, однако некоторое количество может поступать в кровоток. Клетки щитовидной железы – единственный источник тиреоглобулина в организме, поэтому определение ТГ в крови пациентов с дифференцированным раком щитовидной железы, после тиреоидэктомии, является прогностическим фактором развития рецидива и метастазов. Основные методы определения концентрации ТГ и антител к нему – различные варианты иммунохимических анализов [1, 2]. До последнего времени для создания диагностических тест-систем, основанных на методе ИФА, как правило, использовался нативный тиреоглобулин, источником которого является ткань щитовидной железы человека, но гетерогенность человеческого ТГ влияет на иммунореактивность белка и, соответственно, на правильность результатов диагностических тестов, основанных на взаимодействии антиген-антитело [3, 4]. Из-за крупных размеров молекулы ТГ и необходимости посттрансляционных модификаций, которые включают в себя гликозилирование и образование дисульфидных связей практически невозможно получить рекомбинантный ТГ в традиционных прокариотических системах. [3]

Альтернативой может стать получение не цельного белка, а фрагментов, характерных для нативного тиреоглобулина. Один из способов получения фрагментов рекомбинантного тиреоглобулина конструирование экспрессирующей системы с помощью трансформации прокариотических клеток экспрессирующим вектором, содержащим фрагмент кДНК гена тиреоглобулина. Для крупных фрагментов ТГ, требующих посттрансляционных модификаций возможно применение эукариотических клеточных линий, трансфицированных экспрессирующим вектором.

Данная работа посвящена одной из ключевых стадий получения вектора для экспрессии фрагмента гена ТГ, включающую в себя амплификацию соответствующей нуклеотидной последовательности методом клонирования в прокариотической системе и установление соответствия клонированного участка гена последовательности, опубликованной в базах данных.

Актуальность и цель работы:

По данным онкологической службы России в 2020 году на рак щитовидной железы приходилось 8,3 % случаев онкологических заболеваний у пациентов в возрасте до 30 лет. Также с 2010 года по 2020 год наблюдался значительный прирост заболеваемости, который составил 3,54 %. Смертность в 2020 г. составила 940 человек на 100 000 населения, среди них 281 мужчина и 659 женщин [5]. При этом большинство случаев злокачественных новообразований (более 90 %) представлено дифференцированным раком щитовидной железы (ДРЩЖ), к которому относят папиллярный рак щитовидной железы и фолликулярный рак щитовидной железы. [6] На начальном этапе лечения многие пациентов с данным заболеванием проходят процедуру полной тиреоидэктомии, и измерение уровня тиреоглобулина (ТГ) в крови после операции – это эффективный способ мониторинга наличия или отсутствия рецидива для долгосрочного наблюдения, помогающий выстроить стратегию дальнейшего лечения. Высокий уровень ТГ в крови после операции считается критерием рецидива или неполного удаления ткани щитовидной железы, так как тиреоциты являются единственным источником данного белка в организме, поэтому после полной тиреоидэктомии содержание ТГ в крови должно постепенно снизиться до нулевого значения. Учитывая минимальный предел количественного определения распространенных коммерческих диагностических тестов, считается, что у пациента отсутствует рецидив, если уровень ТГ в крови ниже 1 нг/мл. [6]

Цель работы – клонирование фрагментов гена тиреоглобулина человека в клетках прокариот, получение и анализ генно-инженерных конструкций, содержащих различные участки тиреоглобулина, что позволит получать рекомбинантные белки, содержащие N и C концевые участки тиреоглобулина, что позволит совершенствовать диагностику и расширить понимание патогенеза аутоиммунных заболеваний щитовидной железы.

В работе были поставлены следующие задачи: выделить тотальную РНК из ткани щитовидной железы и синтезировать двухцепочную кДНК методом обратной транскрипции ОТ-ПЦР на матрице мРНК ТГ; получить фрагменты экспрессирующей последовательности гена ТГ методом ПЦР на матрице кДНК; сконструировать клонирующий вектор, содержащий фрагменты экспрессирующей последовательности гена ТГ; клонировать полученный вектор в клетках *E. coli* штамм XL1-Blue; провести анализ полученной генно-инженерной конструкции.

Материалы и методы

Объект исследования: ткань ЩЖ, полученная от пациента. Выделение мРНК: ткань ЩЖ замораживали в жидком азоте и гомогенизировали. Нуклеиновые кислоты очищали от белков и разделяли методом ультрацентрифугирования при 100 000 g в градиенте цезия хлорида. Для получения кДНК использовали ферментативный синтез двухцепочечной кДНК на poly (A)+ – мРНК.

Для трансформации использовали компетентные клетки *Escherichia coli*, штамм XL1 Blue («Евроген», Россия).

Олигонуклеотидные праймеры были подобраны на основе последовательностей нуклеотидов, собранных в Gen Bank с использованием онлайн-программы Primer Blast. Синтезировали пять пар праймеров на различные участки, соответствующие кДНК гена ТГ: первый участок размером 588 п.н. (7381–7968 п.н.), второй участок размером 770 п.н. (7244–8013 п.н.), третий участок размером 864 п.н. (2297–3160 п.н.), четвертый участок размером 902 п.н. (4629–5530 п.н.), пятый участок размером 833 п.н. (5529–6361 п.н.) Олигонуклеотиды для амплификации участков кДНК гена ТГ были синтезированы компанией «Евроген» (Россия). Дизайн олигонуклеотидов проводили в программе Blast NCBI. В качестве матричной последовательности использовали последовательность мРНК тиреоглобулина NM_003235.5, опубликованную в базе данных GeneBank.

Методом ПЦР проведена амплификация фрагментов ДНК различной длины, содержащих участки нуклеотидной последовательности кДНК гена ТГ, для последующего клонирования в векторные системы. проводили с помощью ПЦР – амплификатора T-100 (Bio-Rad). Полученные ПЦР-продукты и пробы ДНК (на этапах клонирования) разделяли методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле. ПЦР – продукты выделяли из геля агарозы с помощью набора реактивов Cleanup Standart по методике, рекомендованной производителем.

Реакцию лигирования проводили с помощью набора Quick-TA kit без предварительной обработки рестриктазами в соответствии с инструкцией к набору. Для клонирования полученных ПЦР – продуктов и контроля экспрессии были использованы векторы: pAL2-T, pVax1.

Результаты и обсуждение

Контроль РНК, выделенной из ткани щитовидной железы, и синтез кДНК гена ТГ.

Выделение тотальной РНК проводили согласно методике, описанной в материалах и методах. Выделенные из ткани щитовидной железы (ЩЖ) семь различных образцов тотальной РНК были разделены методом электрофореза в 1,5 % в геле агарозы при напряжении 75 В. Полученная электрофореграмма образцов РНК представлена на рисунке 1.

На матрице выделенной poly(A) – мРНК провели ферментативный синтез двухцепочечной кДНК, включая синтез первой и второй цепи и расщепление петли, связывающей цепи кДНК, нуклеазой S1, специфически разрушающей одноцепочечные участки нуклеиновых кислот. Синтез первой цепи кДНК проводили с помощью РНК-зависимой ДНК полимеразы, олиго 3'-праймера, содержащего олиго(dT) последовательность и олигонуклеотидного адаптера, содержащего олиго(dG) последовательность на 3'-конце. Для синтез второй цепи кДНК использовали метод ПЦР с ДНК-полимеразой I *E. coli* и праймером M13, соответствующим внешней части олигонуклеотидного адаптера и 3'-праймера. Препарат кДНК хранили при температуре минус 20 °С.

В качестве матрицы для амплификации была использована кДНК из ткани щитовидной железы, синтезированная ранее. С целью оптимизации условий проведения ПЦР для амплификации описанных участков экспрессирующейся последовательности кДНК гена ТГ человека использовали градиент температуры на стадии отжига праймеров (диапазон градиента 58–64 °С). Были получены ПЦР продукты длиной 800–1000 п.н. с использованием пары праймеров 864 п.н. при температуре отжига праймеров 58 и 60 °С и с использованием пары праймеров 833 п.н. при температуре отжига праймеров 62 и 64 °С. Также был получен продукт длиной 770 п.н. с использованием пары праймеров 770 п.н. при температуре отжига праймеров 60 °С. Исходя из приведенных результатов, наиболее оптимальная температура отжига для пары праймеров 864 п.н. составила 58 °С, для пары праймеров 833 п.н. – 62 °С. Для пары праймеров 770 п.н. оптимальная температура отжига составила 60 °С.

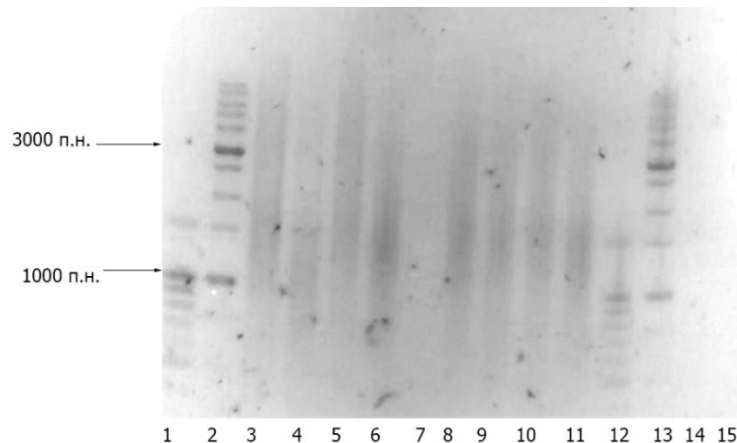


Рисунок 1 – Электрофореграмма образцов РНК в 1,5 % агарозном геле дорожки 1,12 – маркер 100 + bp DNA Ladder; дорожки 2, 13 – маркер 1 kb DNA Ladder; дорожка 3 – РНК образец № 1; дорожка 4 – РНК образец № 2; дорожка 5 – РНК образец № 3; дорожка 6 – РНК образец № 4; дорожки 7, 14, 15 – пустые; дорожка 8 – РНК образец № 5; дорожка 9 – РНК образец № 6; дорожки 10,11 – РНК образец № 7

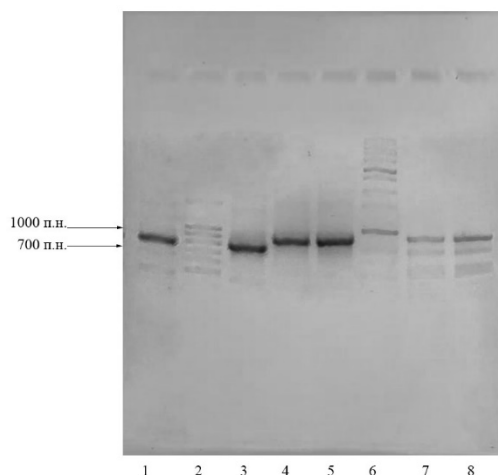


Рисунок 2 – Электрофореграмма ПЦР продуктов (образцы 1–6) в 1,5 % геле агарозы: дорожка 1 – образец 1 (770 п.н.); дорожка 2 – маркер длин 100+bp; дорожка 3 – образец 2 (770 п.н.); дорожка 4 – образец 3 (864 п.н.); дорожка 5 – образец 4 (864 п.н.); дорожка 6 – маркер длин 1kb; дорожка 7 – образец 5 (902 п.н.); дорожка 8 – образец 6 (902 п.н.)

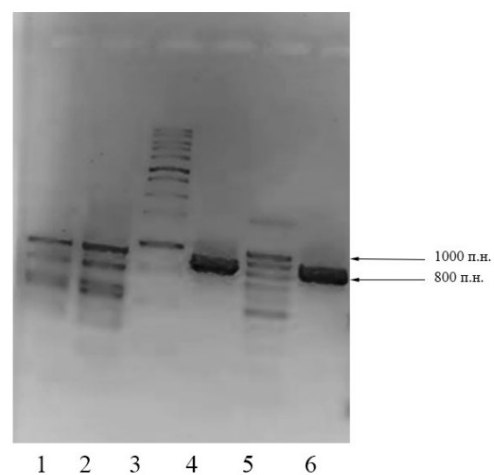


Рисунок 3 – Электрофореграмма ПЦР продуктов (образцы 5–8) в 1,5 % геле агарозы: дорожка 1 – образец 5 (902 п.н.); дорожка 2 – образец 6 (902 п.н.); дорожка 3 – маркер длин 1kb; дорожка 4 – образец 7 (833 п.н.); дорожки 5 – маркер длин 100+bp; дорожка 6 – образец 8 (833 п.н.)

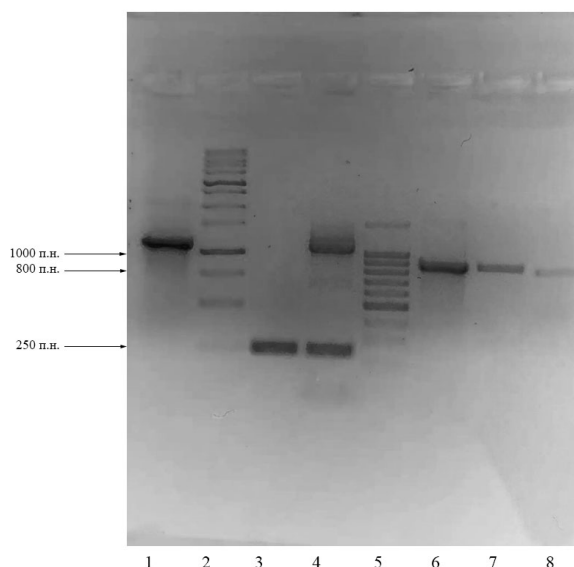


Рисунок 4 – Электрофореграмма ПЦР продуктов, полученных на праймерах M13 и специфических праймерах в 1,5 % геле агарозы: дорожка 1 – образец 7 культура 4/1 (864 п.н.); дорожка 2 – маркер длин 1kb; дорожка 3 – образец 8 культура 4/2 (864 п.н.); дорожка 4 – образец 9 культура 7/1 (833 п.н.); дорожка 5 – маркер длин 100+bp; дорожка 6 – образец 16 культура 4/1 (864 п.н.); дорожка 7 – образец 17 культура 4/2 (864 п.н.); дорожка 8 – образец 18 культура 7/1 (833 п.н.)

Полученные ПЦР продукты длиной 770 п.н. (образцы 1,2), 864 п.н. (образцы 3,4) и 833 п.н. (образцы 7,8) были выделены из геля агарозы и очищены при помощи набора Cleanup Standard согласно инструкции производителя, рисунки 2, 3.

Выделенные ПЦР продукты, содержащие нематричные дезоксиаденозины были встроены в вектор для клонирования под действием Т4 ДНК лигазы. Всего было получено 6 образцов лигазной смеси, в которых ампликоны были представленными полученными ранее ПЦР продуктами. Лигирование проводили согласно методике, описанной в материалах и методах.

Компетентные клетки *E. coli* штамм XL1-Blue были трансформированы полученными образцами лигазной смеси согласно стандартному протоколу.

В результате трансформации и проведения бело-голубой селекции было отобрано по 2 белые колонии каждого из 6 вариантов трансформированных клеток. Отобранные колонии затем культивировались в течение ночи в среде LB с ампициллином. В результате проведения ПЦР с праймерами M13 были получены ПЦР продукты длиной 1109 п.н. на матрице плазмидной ДНК, выделенной из рекомбинантных культуры клеток *E. coli* 4/1, и длиной 1015 п.н. на матрице плазмидной ДНК, выделенной из культуры 7/1. Длина продуктов полностью соответствовала длине сайта поликлонирования, содержащего целевую вставку. При проведении ПЦР с праймерами 864 п.н. на матрице плазмидной ДНК, выделенной из рекомбинантных культур 3/1, 3/2, 4/1, 4/2 были получены продукты длиной 864 п.н., длина продукта, полученного с использованием пары праймеров 833 п.н. на матрице плазмидной ДНК культуры 7/1, составила 833 п.н., рисунок 4. В обоих случаях длина амплифицированных фрагментов полностью соответствовала длине вставки. Дальнейший анализ плазмидной ДНК культур 1/1, де 1/ 2, 2/1, 2/2, проведенный с использованием праймеров M13 и праймеров, специфичных для вставки длиной 770 п.н., не показал наличия вставки в составе вектора. Была определена нуклеотидная последовательность полученных векторов, содержащие участки кДНК гена ТГ. Для участков 864 п.н. (последовательность кДНК гена ТГ 2297–3160 п.н.) и 833 п.н. (последовательность кДНК гена ТГ 5529–6361 п.н.). методом секвенирования была подтверждена полная идентичность, опубликованной в Gen Bank последовательности мРНК тиреоглобулина NM_003235.5. Полученные вставки, содержащие фрагменты кДНК гена ТГ были перенесены в экспрессирующий вектор pVAX 1 для дальнейшей трансфекции в клеточную линию СНО.

Заключение

В нашей работе представлены результаты клонирования двух участков последовательности гена тиреоглобулина человека длиной 864 п.н. (последовательность кДНК гена ТГ 2297–3160 п.н.) и 833 п.н. (последовательность кДНК гена ТГ 5529–6361 п.н.). Для участков 864 п.н. (последовательность кДНК гена ТГ 2297–3160 п.н.) и 833 п.н. (последовательность кДНК гена ТГ 5529–6361 п.н.) методом секвенирования была подтверждена полная идентичность, опубликованной в Gen Bank последовательности мРНК тиреоглобулина NM_003235.5. Полученные вставки, содержащие фрагменты кДНК гена ТГ были перенесены в экспрессирующий вектор pVAX 1 для дальнейшей трансфекции в клеточную линию СНО. Получение рекомбинантных белков, содержащих отдельные антигенные детерминанты тиреоглобулина человека позволит использовать рекомбинантные белки для совершенствования высокочувствительных иммунохимических тестов нового поколения для определения тиреоглобулина в крови пациентов с дифференцированным раком щитовидной железы, а также для выявления специфических аутоантител в сыворотке крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы. Дальнейшие исследования в этом направлении будут направлены на клонирование других участков гена тиреоглобулина, имеющих большое значение для формирования заболеваний щитовидной железы человека, на разных этапах развития заболевания для проведения ранней диагностики и специфического лечения.

Литература

1. Giovanella, L., Feldt-Rasmussen, U., Verburg F.A., Grebe S.K., Plebani M. and Clark P.M. Thyroglobulin measurement by highly sensitive assays: focus on laboratory challenges // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. – 2015. – Vol. 53. – № 9. – P. 1301–1314
2. Netzel B.C., Grebe S.K., Carranza Leon BG, et al. Thyroglobulin (Tg) Testing Revisited: Tg Assays, TgAb Assays, and Correlation of Results With Clinical Outcomes // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2015. – Vol. 100. – № 8. – P. E1074–E1083
3. Powell R. et al. Recombinant expression of homodimeric 660 kDa human thyroglobulin in soybean seeds: An alternative source of human thyroglobulin // *Plant Cell Rep*. – 2011. – Vol. 30. – № 7. – P. 1327–1338.
4. Saboori AM. et al. Iodination of human thyroglobulin (Tg) alters its immunoreactivity. I. Iodination alters multiple epitopes of human Tg // *Clin Exp Immunol*. – 1998. – Vol. 113. – № 2. – P.297–302.
5. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность) – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России – 2021. – илл. – 252 с.
6. Haugen B.R, Alexander E.K., Bible K.C., et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer // *Thyroid*. – 2016. – Vol. 26. – № 1. – P. 1–133.