

## Экспрессия секретлируемого рекомбинантного пролактина человека в клетках насекомых

Л. И. Строковская, И. М. Кихно, Р. А. Мелешко, А. П. Соломко

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

---

*Пролактин человека синтезирован с помощью рекомбинантного бакуловируса в культуре клеток насекомых как растворимый внеклеточный белок. Выход варьировал в пределах 20–30 мг на 1 л среды. Рекомбинантный пролактин был биологически активен в пролиферативном тесте с использованием Nb2 клеток лимфомы крыс.*

---

**Введение.** Гормон пролактин является жизненно необходимым белком, без которого организм или погибает, или теряет способность производить потомство. В литературе описано более 300 различных биологических активностей этого белка [1]. Такое разнообразие действия пролактина объясняется его структурным полиморфизмом, возможностью локального синтеза и разными сигнальными путями действия. Известно, что пролактин синтезируется не только в гипофизе, где он собственно и был впервые обнаружен, но и в клетках центральной нервной системы, молочных желез, половых органов, эпителиальных клетках, потовых железах, фибробластах, клетках раковых опухолей.

Основная форма пролактина — белок с молекулярной массой 23 кДа. Но обнаружено еще несколько вариантов этого белка, которые могут быть следствием альтернативного сплайсинга первичного транскрипта, протеолиза или других посттрансляционных модификаций, таких как димеризация и полимеризация, гликозилирование, фосфорилирование, амидирование.

Нами ранее показана возможность экспрессии рекомбинантного пролактина человека в бакуловирусной системе [2, 3]. При использовании экспрессивной системы Vac-to-Vac рекомбинантный пролактин накапливался внутри клеток насекомых в виде гранул и для его солюбилизации и очистки были использованы денатурирующие условия [3, 4]. И хотя полученный рекомбинантный пролактин

был биологически активен, существовала возможность частичной потери активности из-за неправильной ренатурации части белка.

Недавно в бакуловирусной системе экспрессии в монослойной культуре клеток получен секретлируемый пролактин человека, причем авторы для экспрессии использовали кДНК пролактина человека с собственным сигнальным пептидом [5].

В данной работе для экспрессии пролактина использована система MaxVac («Invitrogen», США), для которой существуют коммерческие векторные конструкции, содержащие под промотором полиэдрина сигнальную последовательность белка мелиттина пчелы [6] и следующий за ним поликлональный сайт. Использование такой конструкции приводит к выходу экспрессированного белка в культуральную среду. В данной системе нами получен растворимый биологически активный рекомбинантный пролактин человека, секретлируемый в среду.

**Материалы и методы. Клетки.** В работе использованы клетки Sf21 (*Spodoptera frugiperda*), выращиваемые в монослое на среде TC100 с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки, и клетки HF (*Trichoplusia ni*), растущие в суспензии на бессывороточной среде Express Five SFM при 100 об/мин. Клетки насекомых и среды для их культивирования получены от фирмы «Invitrogen».

Для трансформации использовали клетки *Escherichia coli* DH5. Рестриктазы, лигаза, Taq-полимераза и набор для полимеразной цепной реакции (ПЦР) получены от MBI «Fermentas» (Литва).

© Л. И. СТРОКОВСКАЯ, И. М. КИХНО, Р. А. МЕЛЕШКО,  
А. П. СОЛОМКО, 2004

Получение рекомбинантной плазмиды *pMelPRL* и рекомбинантного вируса *MelPRL*. Для получения рекомбинантной плазмиды *pMelPRL* кДНК гена пролактина вырезали из плазмиды *pFastPRL* [3] по сайтам *Bam*HI и *Kpn*I. После разделения в агарозном геле фрагмент вырезали и очищали на колонках с целлюлозно-ацетатными фильтрами Spin-X («Costar», США) и лигировали с плазмидой *pMelBacB* («Invitrogen»), обработанной этими же рестриктазами. Полученная рекомбинантная плазида *pMelPRL* содержала под контролем промотора гена полиэдрина вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) *Autographa californica* (Ac) кДНК гена пролактина с сигнальной последовательностью мелиттина на N-конце. Схема конструирования представлена на рис. 1.

Рекомбинантный вирус *MelPRL* получали при котрансфекции клеток Sf21 плазмидной и линейаризованной вирусной ДНК ВЯП Ac MNPV в соответствии с модифицированным протоколом фирмы «Invitrogen»: 1) ДНК плазмиды *pMelPRL* (2,5 мкг) смешивали с вирусной ДНК (0,25 мкг) в 100 мкл TC100; 2) липофектин («Gibco», «BRL», США) (7 мкл) суспендировали в 100 мкл TC100. Обе смеси (1 и 2) объединяли и инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре. Затем трансфекционную смесь доводили до 1 мл TC100 и добавляли к монослою клеток Sf21 ( $0,9 \cdot 10^6$ ). Через 5 ч инкубации при температуре 27 °C смесь ДНК отбирали и заменяли на TC100 с 10 % FBS. Через 5 дней после трансфекции супернатант отбирали и использовали для клонирования вируса. Для этого вирус-содержащий супернатант разводили в  $10^4$ – $10^5$  раз и заражали монослой клеток Sf21 —  $1 \cdot 10^6$  клеток на чашку диаметром 30 мм.

После инкубации вируса с клетками на протяжении 1 ч вирус отбирали и на монослой наносили 0,5 %-ю агарозу, содержащую X-gal (50 мкг/мл) и IPTG (40 мкг/мл). Через 5–6 дней появлялись белые и голубые бляшки. Голубые бляшки, содержащие рекомбинантный вирус, тщательно исследовали под микроскопом при увеличении 30–40, а затем в инвертированном микроскопе при увеличении 200–400 на наличие полиэдров. Бляшки, не содержащие полиэдров, использовали для выделения вирусной ДНК и последующего ПЦР анализа, чтобы идентифицировать бляшки, содержащие чистый рекомбинантный вирус.

**Выделение вирусной ДНК.** Клетки Sf21 ( $5 \cdot 10^5$ ) в log-фазе роста помещали в чашки диаметром 30 мм, объем среды 2 мл. Бляшку, отобранную пастеровской пипеткой, вместе с агарозой переносили в среду. После инкубации в течение трех дней при температуре 27 °C клетки тщательно анализи-

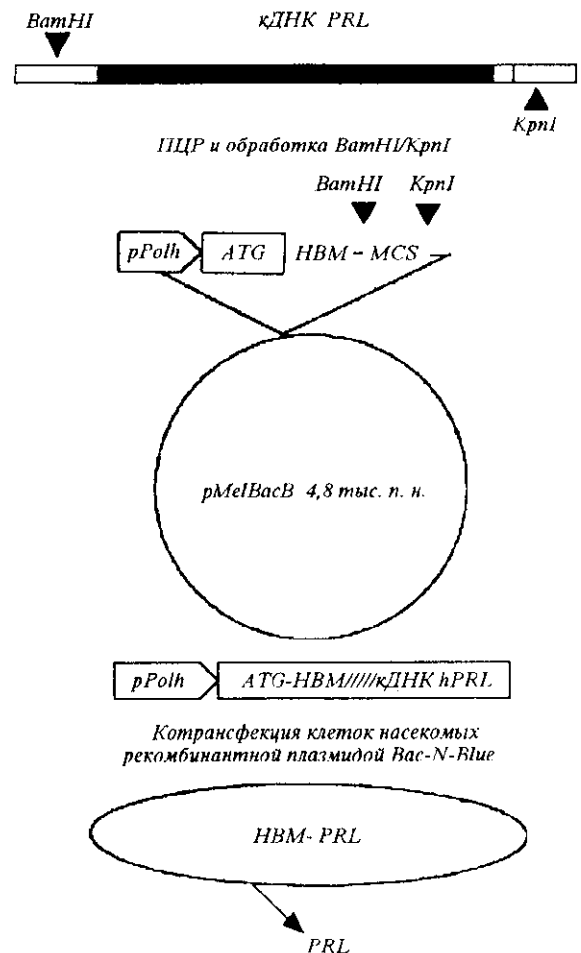


Рис. 1. Схема конструирования рекомбинантного вируса *MelPRL*: *pPolh* — промотор гена полиэдрина; *HBM* — сигнальная последовательность мелиттина (пчелы); *PRL* — пролактин

ровали на присутствие полиэдров. Отбирали только те чашки, в которых не было выявлено полиэдров (оос). Из оос чашек для выделения ДНК отбирали по 1,0 мл среды, центрифугировали для освобождения от дебриса при 5000 об/мин в течение 5 мин, а затем для осаждения вирусных частиц центрифугировали при 14000 об/мин (30 мин, 4 °C). Вирусный осадок суспендировали в 100 мкл ТЕ, добавляли 10 мкл протеиназы К (10 мг/мл) и инкубировали в течение 1 ч при 55 °C.

Затем проводили экстракцию с равным объемом смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (25:24:1) («Sigma», США), центрифугировали при 14000 об/мин (5 мин) и к супернатанту добавляли 1/10 объема 3 М ацетата натрия, 1 мкл гликогена («Sigma») и 2,5 объема 96 %-го этанола. Инкубировали при температуре –20 °C (30 мин), затем центрифугировали при 14000 об/мин в течение 15 мин. Осадок отмывали 2 раза 70 %-м этанолом,

подсушивали на воздухе, растворяли в 10 мкл стерильной воды и проводили ПЦР.

Для ПЦР использовали следующие праймеры: прямой — 5'-TTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTT-G-3' и обратный — 5'-CAACAACGCACAGAATCT-AGC-3'.

Состав инкубационной смеси: вирусная ДНК — 1 мкл; 10 × ПЦР буфер — 1 мкл; 10 мМ dNTP — 0,5 мкл; прямой праймер — 5 нМ; обратный праймер — 5 нМ; Taq-полимераза — 1 ед.

Объем был доведен водой до 10 мкл.

Реакцию проводили в термоциклере «Perkin Elmer 9600» (США) при следующих параметрах: начальный цикл — 94 °С, 2 мин; 30 циклов — денатурация (94 °С, 30 с), отжиг (55 °С, 60 с), достраивание (72 °С, 90 с); заключительное достраивание (72 °С, 5 мин).

Пробы анализировали в 1 %-м агарозном геле.

В дальнейшей работе использовали только те вирусные препараты, в которых при ПЦР был выявлен фрагмент пролактина соответствующего размера и не было примеси гена полиэдрина, амплифицирующегося из ДНК вируса дикого типа, если этот вирус как примесь присутствует в препарате рекомбинантного вируса.

*Инфицирование культур клеток насекомых.* Вирус *MelPRL* амплифицировали в клетках Sf21 в течение 10 дней и титр его составлял  $(5-7) \cdot 10^7$  БОЕ/мл. Суспензионную культуру клеток HF инфицировали вирусом с множественностью 1—5 БОЕ на клетку. Для исследования кинетики экспрессии рекомбинантного пролактина клетки и среду отбирали через каждые 24 ч после заражения. Среду и лизат клеток наносили на ПААГ с последующим вестерн-блот анализом.

*Получение и очистка секретируемого пролактина.* Инфицированные клетки из 100 мл культуры осаждали, центрифугируя их при 5000 об/мин, и отбрасывали. К супернатанту добавляли сернокислый аммоний до конечной концентрации 80 %, инкубировали на льду в течение 30 мин, затем центрифугировали при 15000 об/мин (4 °С) в течение 30 мин. Полученный осадок растворяли в 2 мл 20 мМ NaCl, 20 мМ трис-НСl, рН 7,2 (буфер А) и диализировали в течение ночи против 1 л этого же буфера. Далее препарат наносили на колонку с гепарин-сефарозой (HiTrap Heparin HP, «Amersham Pharmacia Biotech AB», Англия).

Непосредственно перед нанесением препарат центрифугировали 10 мин при 14000 об/мин (4 °С). Несвязавшиеся белки отмывали буфером А. Элюцию связавшихся белков проводили ступенчато — сначала 10 мл 0,5 NaCl, 20 мМ трис-НСl, рН 7,2 (буфер Б), а затем 10 мл 1 М NaCl, 20 мМ

трис-НСl, рН 7,2 (буфер В). Собирали фракции по 1 мл. В работе использовали хроматографическую систему BioLogic («Bio-Rad», США) с регистрацией при длине волны 280 нм. Хроматографию проводили при 4 °С. В полученных при разделении на колонке фракциях определяли наличие пролактина с помощью анализа в 12 %-м ПААГ и последующей иммунодетекции с использованием поликлонального анти-пролактин-антитела. Разделения в ПААГ и вестерн-блот анализ проводили по методу [4].

*Биологическую активность пролактина* определяли босуществляли в пролиферативном тесте с применением пролактин-зависимых Nb2 клеток лимфомы крыс, как описано ранее [3].

**Результаты и обсуждение.** В предыдущих работах мы показали, что биологически активный рекомбинантный пролактин человека эффективно синтезируется в бакуловиральной системе экспрессии *Vac-to-Vac* [3, 4]. В этих работах использована кДНК гена пролактина человека [7], не содержащая сигнальной последовательности, и поэтому синтезированный белок оставался внутри клеток насекомых и накапливался в виде гранул. Для солюбилизации агрегированного пролактина применяли денатурирующие условия с последующей ренатурацией [3, 4]. Получаемый пролактин был биологически активен, но в условиях перехода от денатурации к ренатурации часть белка может не восстанавливать своей структуры и активности. С учетом этого в представленной работе использована бакуловиральная система *MaxVac*, позволяющая выделять секретируемый в среду рекомбинантный белок.

В основе этой системы для конструирования рекомбинантных векторов лежит рекомбинация между гомологичными последовательностями вирусной ДНК и транспортного вектора, происходящая в течение трансфекции. Вирусная ДНК, используемая в данной системе, была модифицирована с помощью сайт-направленного мутагенеза. В нее введены три уникальных сайта для рестриктазы *Bsu36I* для получения *Vac-N-Blue DNA* — полностью линейаризованной ДНК с делециями *ORF* гена полиэдрина и 3'-концевого участка гена *ORF1629*, необходимого для репликации вируса [8]. Полная последовательность *ORF1629* содержится в транспортном векторе, в который встраивают необходимый ген. В результате гомологической рекомбинации между последовательностями, граничащими с местом встраивания гетерологичного гена (*ORF603* и *ORF1629*), реплицируются только рекомбинантные вирусы.

Схема конструирования рекомбинантного век-

тора, содержащего ген пролактина человека, представлена на рис. 1. кДНК гена пролактина, вырезанную из плазмиды *pFastPRL*, встраивали в вектор *pMelVacB*. В результате создан рекомбинантный транспортный вектор *pMelPRL*, содержащий под промотором гена полиэдрина кДНК гена пролактина с сигнальной последовательностью белка мелиттина на 5'-конце. Далее в результате котрансфекции этого вектора с *Vac-N-Blue* ДНК и последующего отбора рекомбинантных (синих) бляшек без примеси дикого вируса (контроль — ПЦР) был получен рекомбинантный вирус *MelPRL*.

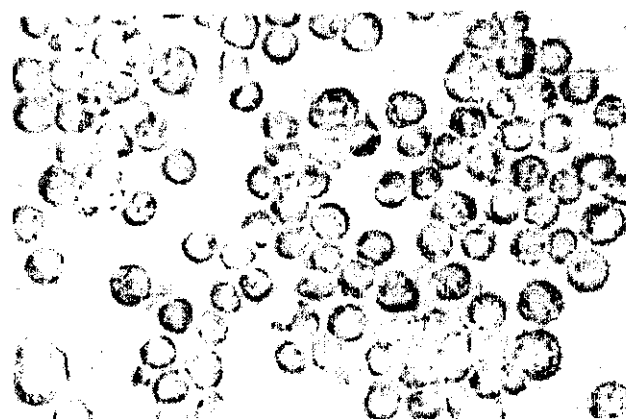
При амплификации этого вируса в клетках Sf21, что достигается инфицированием культуры вирусом с множественностью 0,1—0,2 БОЕ на клетку, обнаружено, что в течение 10—12 дней клетки не разрушаются. Более того, у некоторых клеток выявлены отростки (рис. 2, б). Такого эффекта не наблюдали для клеток, зараженных диким бакмидным вирусом (рис. 2, а) Можно предположить, что выходящий в среду пролактин имеет свойство предохранять клетки насекомых от гибели, что находится в соответствии с данными об антиапоптотическом действии пролактина [9]. Помимо этого, наличие отростков у зараженных клеток может свидетельствовать о том, что рекомбинантный пролактин действует как ростовой гормон.

При заражении клеток HF вирусом с множественностью 1—5 БОЕ на клетку через 48 ч в культуральной среде появлялся пролактин, количество которого не менялось в течение 144 ч после инфицирования (рис. 3). Поэтому в последующей работе для получения пролактина использовали среду через 48 ч после заражения.

Биологическую активность определяли в среде через 48 ч после заражения. Количество пролактина в ней выявляли с помощью иммуоферментного метода на автоматическом анализаторе Ахум («Abbot Laboratory», США). Затем находили зависимость между увеличением числа клеток Nb2 при добавлении возрастающих количеств пролактина.

В качестве контроля использован коммерческий препарат человеческого пролактина, присутствующий в наборе. Установлено, что концентрация пролактина, при которой наблюдается достижение половины максимального прироста клеток Nb2 для пролактина человека, составляет  $510 \pm 35$  и  $480 \pm 28$  пг/л для препарата *MelPRL*, очищенного на гепарин-сефарозной колонке. Эти данные означают, что рекомбинантный пролактин человека, секретлируемый в среду при экспрессии в клетках насекомых, имеет примерно такую же активность, как и пролактин человека.

Для очистки рекомбинантного пролактина сре-



а



б

Рис. 2. Культура клеток Sf21: а — здоровые клетки; б — зараженные вирусом *MelPRL* с множественностью 0,1—0,2 БОЕ на клетку

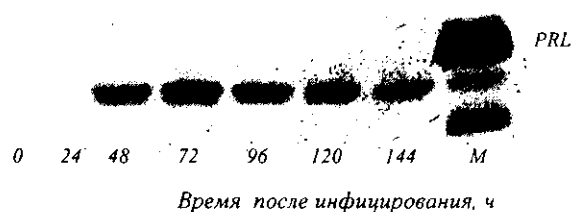


Рис. 3. Вестерн-блот анализ динамики экспрессии рекомбинантного пролактина в клетках HF (секреция в среду). Нанесено по 20 мкл среды на ячейку (PRL — пролактин)

ду вначале концентрировали сернокислым аммонием, а затем разделяли на колонке с гепарин-сефарозой. Связывание с гепарином — недавно обнаруженное свойство пролактина человека [10]. Как известно, две консенсусные последовательности участвуют в связывании с гепарином — ХВВХХВХ, где В — основная аминокислота (Arg, Lys и изредка Hys), а Х — любая гидрофобная аминокислота.

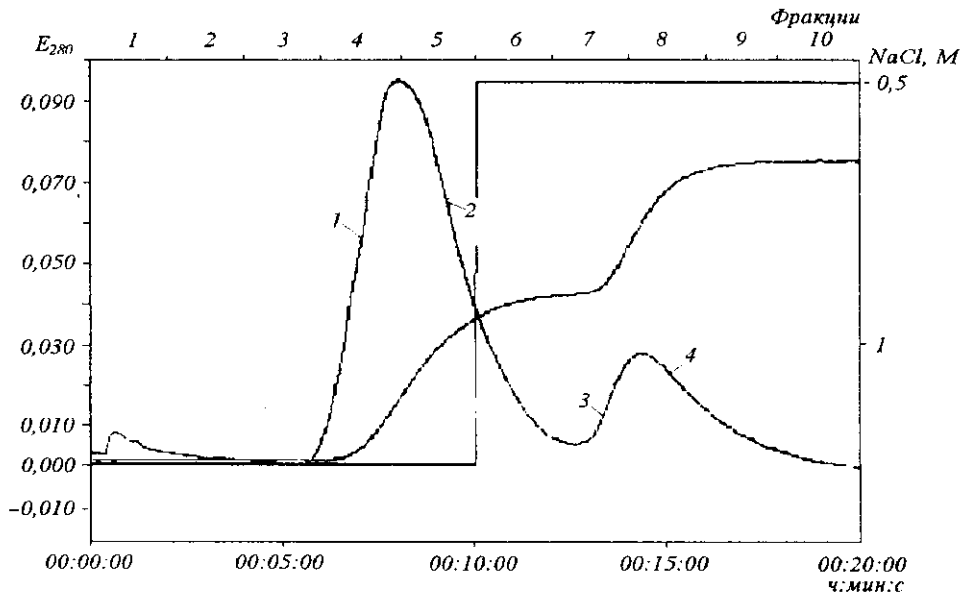


Рис. 4. Разделение рекомбинантного пролактина на колонке с гепарин-сефарозой: пролактин элюируется в 0,5 М NaCl (основной пик), в 1 М NaCl элюируются альбумин и другие белки (минорный пик). Цифрами 1—4 на графике обозначены номера фракций (см. рис. 5), подвергнутые электрофоретическому анализу

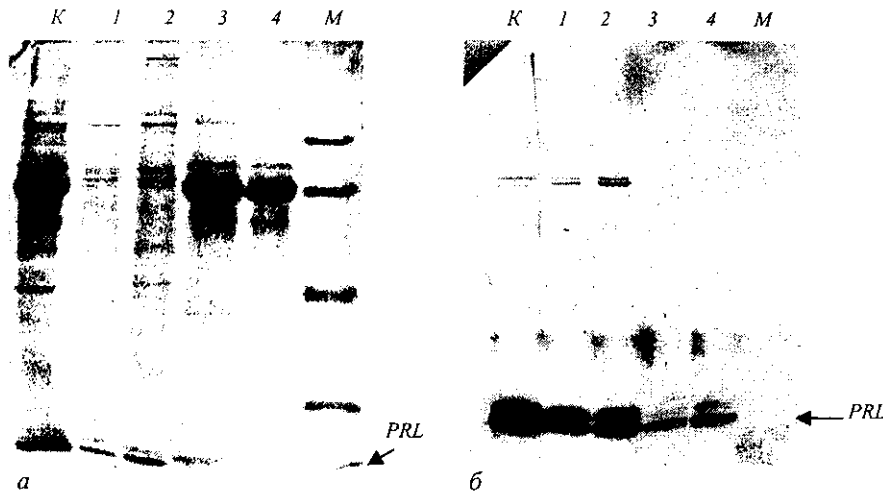


Рис. 5. Анализ фракций, полученных при разделении рекомбинантного пролактина на колонке с гепарин-сефарозой: а — электрофорез в 12 %-м ПААГ; б — вестерн-блот (PRL — пролактин); К — контроль (раствор белка до очистки на колонке); 1 — фракция элюата 0,5 М NaCl; 2 — то же; 3 — фракция элюата 1 М NaCl; 4 — то же; М — белковый маркер

В пролактине человека есть две такие последовательности — одна между остатками 41—47 (Asp-Lys-Arg-Tyr-Thr-His-Gly) и другая между остатками 175—181 (Leu-Arg-Arg-Asp-Ser-His-Lys). Присутствие таких гепарин-связывающих мотивов позволило использовать для очистки рекомбинантного пролактина человека гепарин-аффинную хроматографию, в частности, гепарин-сефарозные колонки.

Как видно из представленных на рис. 4 данных, при разделении на колонке белковый материал выходит двумя пиками — в 0,5 и в 1,0 М NaCl. На рис. 5, а, показаны результаты разделения в 12 %-м ПААГ, а на рис. 5, б — вестерн-блот фракций 1 и 2 из элюата в 0,5 М NaCl и фракций 3 и 4, элюируемых 1 М NaCl. Из приведенных данных следует, что рекомбинантный пролактин элюирует-

ся в 0,5 М NaCl, а в 1 М NaCl элюируются другие белки, из которых основную массу составляет альбумин. Пролактин на геле представлен двумя полосами — 23 и 25 кДа. Как известно [11, 12], такие размеры имеют гликозилированный и негликозилированный пролактины. Недавно показано [5], что в бакуловирусной системе рекомбинантный пролактин человека также гликозилируется. Авторы для экспрессии пролактина использовали систему Вас-to-Вас и кДНК пролактина человека с собственным сигнальным пептидом. В процессе прохождения через секреторные пути клеток насекомых сигнальный пептид отделялся от белка, что было подтверждено анализом N-концевой последовательности секреторируемого пролактина. В нашей работе использовали сигнальный пептид мелиттина и также наблюдали выход пролактина в среду.

Таким образом, рекомбинантный пролактин человека, синтезируемый в клетках насекомых, процессируется и модифицируется подобно пролактину в клетках млекопитающих.

Уровень пролактина в среде и в препарате после очистки на гепарин-сефарозе (фракции 1 + 2) определяли с помощью иммуоферментного метода на автоматическом анализаторе Ахум («Abbot Laboratory»). Количество пролактина в среде варьировало от 20 до 30 мг/л среды. Количество пролактина во фракции ( $V = 2$  мл) после очистки на колонке составляло примерно 500 мкг/мл. В пересчете на 1 л среды это равно 10 мг очищенного пролактина. Примерно половина и даже более пролактина теряется при концентрировании и последующем разделении на колонке, что свидетельствует о необходимости совершенствования метода очистки.

**Выводы.** Использование бакуловирусной системы экспрессии позволяет получить секретируемый рекомбинантный пролактин человека, который процессируется и модифицируется подобно пролактину в клетках млекопитающих и человека. Размер и биологическая активность рекомбинантного пролактина также близки его природному аналогу. Преимуществом является и значительно больший уровень экспрессии продукта — до 20–30 мг/л среды, а также возможность одноэтапной очистки на гепарин-сефарозной колонке с выходом пролактин примерно 10 мг/л среды.

L. I. Strokovskaya, I. M. Kikhno, R. A. Meleshko, A. P. Solomko

Expression of extracellular human prolactin in insect cells

#### Summary

Human prolactin was expressed in the insect culture cells as a soluble extracellular protein using recombinant baculoviruses. The yield varied between 20–30 mg/l medium. This recombinant prolactin was biologically active in the Nb2 rat lymphoma cells proliferation assay.

Л. И. Строчковська, І. М. Кіхно, Р. А. Мелешко, О. П. Соломко

Експресія позаклітинного пролактину людини у клітинах комах

#### Резюме

За допомогою рекомбінантного бакуловірусу в культурі клітин комах синтезовано пролактин людини як розчинний позаклітинний білок. Вихід варіював у межах 20–30 мг на 1 л

середовища. Рекомбінантний пролактин був біологічно активним у проліферативному тесті із застосуванням Nb2 клітин лімфоми щурів.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Bole-Feysot Ch., Goffin V., Edery M., Binart N., Kelly P. A. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice // *Endocrine Rev.*—1998.—19.—P. 225–268.
2. Строчковская Л. И., Калинина Н. О., Кихно И. М., Соломко А. П. Экспрессия рекомбинантного пролактина человека с использованием бакуловирусного вектора на основе вируса ядерного полиэдрома *Malacosoma neustria* // *ДАН УССР.*—1997.—36.—С. 166–169.
3. Strokovskaya L., Bartoszewicz Z., Szolajska E., Kikhno I., Solomko A., Michalik J. Expression and one-step purification of intracellular human prolactin in insect cells // *Protein Exp. Purif.*—2001.—22.—P. 242–248.
4. Строчковская Л. И., Мелешко Р. А., Кихно И. М., Соломко А. П. Сравнительное исследование эффективности экспрессии рекомбинантного пролактина человека в двух бакуловирусных системах // *Биополімери і клітина.*—2002.—18, № 5.—С. 423–428.
5. Das T., Johns P. W., Goffin V., Kelly P., Kelder B., Kopchick J., Buxton K., Mukerji P. High-level expression of biologically active human prolactin from recombinant baculovirus in insect cells // *Protein Exp. Purif.*—2000.—20.—P. 265–273.
6. Tessier D. C., Thomas D. Y., Khouri H. E., Laliberte F., Vernet T. Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide // *Gene.*—1991.—98.—P. 177–183.
7. Золотухин С. Б., Маркелова Е. Ю., Панасенко Г. В., Швед А. Д. Метод быстрого клонирования специфических кДНК. Клонирование кДНК пролактина человека // *Биополімери і клітина.*—1989.—5, № 6.—С. 87–92.
8. Kitts P. A., Posse R. D. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency // *Bio-Techniques.*—1993.—14.—P. 810–817.
9. Al-Sakkaf K. A., Mooney L. M., Dobson P. R. M., Brown B. L. Possible role for protein kinase B in the anti-apoptotic effect of prolactin in rat Nb2 lymphoma cells // *J. Endocrinol.*—2000.—167.—P. 85–92.
10. Kurana S., Kuns R., Ben-Jonatan N. Heparin-binding property of human prolactin: a novel aspect of prolactin biology // *Endocrinology.*—1999.—140.—P. 1026–1029.
11. Lewis U. J., Singh R. N. P., Sinha Y. N., Vanderlaan W. P. Glycosylated human prolactin // *Endocrinology.*—1985.—126.—P. 359–363.
12. Price A. E., Logvinenko K. B., Higgins E. A., Cole E. S., Richards S. M. Studies on the microheterogeneity and *in vitro* activity of glycosylated and nonglycosylated recombinant human prolactin separated using a novel purification process // *Endocrinology.*—1995.—136.—P. 4827–4833.

УДК 575.1:597.828

Надійшла до редакції 01.12.03