



УДК 57.214.622

© С. П. Коваленко, Н. П. Мертвцов, 1990

## ЭКСПРЕССИЯ В *ESHERICHIA COLI* ГЕНА АНГИОГЕНИНА ЧЕЛОВЕКА, ТРАНСЛЯЦИОННО СЛИТОГО С N-КОНЦЕВЫМ ФРАГМЕНТОМ $\beta$ -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ

Методом олигонуклеотид-направленного мутагенеза из фага M13mp8 с проклонированным синтетическим геном ангиогенина человека получен фаг M13mp8, кодирующий слитый белок ангиогенин— $\alpha$ -пептид  $\beta$ -галактозидазы *E. coli* (фаг M1-1). Продемонстрировано, что в клетках, инфицированных фагом M1-1, синтезируется пептид, обладающий  $\alpha$ -донорской активностью. Проведена оценка количества слитого белка на разных стадиях роста клеточной культуры, инфицированной фагом M1-1.

**Введение.** При получении генноинженерных продуцентов оценка уровня экспрессии гетерологичных генов в *E. coli* часто затруднена из-за сложности или даже отсутствия функциональных тестов, позволяющих определить количества целевого продукта в клетках. Один из возможных подходов к созданию универсальных систем оценки количества рекомбинантных белков — конструирование полипептидов, содержащих наряду с целевой аминокислотной последовательностью какой-либо дополнительный, легко тестируемый маркер. Таким маркером может служить, в частности,  $\alpha$ -пептид  $\beta$ -галактозидазы *E. coli*, способный к  $\alpha$ -комплементации с  $\Delta$ M15 $\beta$ -галактозидазой *E. coli* с формированием активного фермента.  $\Delta$ M15 $\beta$ -галактозидаза представляет собой белок, не обладающий  $\beta$ -галактозидазной активностью, в котором отсутствует N-концевая аминокислотная последовательность нормальной  $\beta$ -галактозидазы *E. coli*. Такой белок формируется в клетках *E. coli*, несущих делецию  $\Delta$ M15gal. При добавлении к раствору с  $\Delta$ M15 $\beta$ -галактозидазой полипептида с недостающей N-концевой последовательностью  $\beta$ -галактозидазы формируется белок, обладающий  $\beta$ -галактозидазной активностью. При этом N-концевой пептид называют  $\alpha$ -донором, дефектную  $\beta$ -галактозидазу —  $\alpha$ -акцептором, а явление формирования белка с ферментативной активностью —  $\alpha$ -комплементацией [6].

$\alpha$ -Пептид представляет удобный маркер для генноинженерных белков, поскольку, с одной стороны, в целом ряде широко распространенных векторов, например, серий M13, pUC, pTZ в непосредственной близости от клонированного фрагмента находится ген lacZ', кодирующий  $\alpha$ -пептид  $\beta$ -галактозидазы *E. coli*, а с другой — известен ряд примеров, где  $\alpha$ -пептид с полипептидными «довесками» самой разной природы обладал способностью к  $\alpha$ -комплементации. Так,  $\alpha$ -донорской активностью обладали слитые с  $\alpha$ -пептидом домены белка A [1], белки фага  $\phi$ X174 [2], продукт гена *gpoC'* [3],  $\alpha$ -2-интерферон человека [4] и ряд других белков [5].  $\alpha$ -Донорская активность тестируется довольно просто — достаточно в исследуемый образец добавить избыток  $\Delta$ M15 $\beta$ -галактозидазы (в виде грубого экстракта клеток *E. coli* штамма JM103) и измерить  $\beta$ -галактозидазную активность в исследуемом образце, которая будет прямо пропорциональна количеству  $\alpha$ -донора [6].

В данной работе описано конструирование единой трансляционной рамки гена ангиогенина человека с геном lacZ' в фаге M13mp8. Формирование такой трансляционной рамки приводит к появлению в *E. coli*, инфицированной соответствующим фагом, белка, обладающего способностью к  $\alpha$ -комплементации  $\Delta$ M15 $\beta$ -галактозидазы *E. coli*.

**Материалы и методы.** В работе использовали штамм *E. coli JM103*, бактериофаг *M13*Анг [7], dNTP, ddNTP, изопропил-β-D-тиогаляктозид (ИПТГ), 5-броминдоксил-3-β-D-галактопиранозид (Y-Gal), *o*-нитрофенилгалактозид (ОНФГ) производства НИКТИ БАВ (Бердск), фенилметилсульфонилфлуорид фирмы «Serva» (ФРГ), ДНКазу I фирмы «Sigma» (США). Олигонуклеотиды синтезированы В. В. Горн (Ин-т биоорг. химии Сиб. отд-ния АН СССР, Новосибирск), как описано ранее [7].




Олигонуклеотид-направленный мутагенез проводили по [9], для анализа нуклеотидной последовательности также использовали метод, примененный в работе [9].

Для оценки количеств α-комплементирующих белков в *M1-1*-инфицированных клетках *E. coli* ночную культуру *JM103* разводили средой YТ×2 [9] до 10<sup>8</sup> клеток в 1 мл, добавляли фаг *M1-1* в соотношении 100 : 1; 250 : 1; 500 : 1, 30 мин инкубировали при 37 °С, разводили средой YТ×2 в 10 раз, растили при встряхивании и 37 °С. Через 2 ч добавляли ИПТГ до 2 мМ, после чего отбирали аликвоты по 0,5 мл через каждые 30—60 мин. Аликвоты центрифугировали, клетки ресуспендировали в буфере, содержащем 0,1 М трис-НСl, рН 8,0; 0,2 М NaCl, 10 М фенилметилсульфонилфлуорид, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,5 мг/мл лизоцима, выдерживали 1 ч при 0 °С, добавляли тритон X-100 до 0,1 %, MgCl<sub>2</sub> до 2,7 мМ, ДНКазу I до 0,1 мг/мл. После 3 ч инкубации добавляли 0,5 мл буфера Z [11], 10—100 мкл экстракта клеток *JM103*, ОНФГ до 0,4 мг/мл. После инкубации 1—20 ч) образцы центрифугировали, измеряли оптическую плотность супернатанта при длине волны 420 нм. Активность β-галактозидазы рассчитывали по [11].

**Результаты и обсуждение.** Ранее нами описан химико-ферментативный синтез гена ангиогенина человека [7]. В соответствии со схемой сборки и клонирования гена ангиогенина получен фаг *M13*Анг, в котором трансляционная рамка ангиогенина совпадает с рамкой α-пептида β-галактозидазы фага *M13mp8*, однако α-пептид не экспрессируется в клетках, инфицированных *M13*Анг из-за наличия двух терминирующих кодонов в конце гена ангиогенина. Возможность замены этих терминирующих кодонов на кодоны для аспарагиновой кислоты и пролина позволяет получить фрагмент ДНК, кодирующий слитый белок ангиогенин — α-пептид. Такой белок, предположительно, может служить эффективным α-донором для ΔM15β-галактозидазы, а значит и детектировать его будет довольно просто даже в незначительных количествах. Последовательность Asp-Pro, привносимая на место стыка полипептидов, соответствующих ангиогенину и α-пептиду, предполагает выщепление ангиогенина из слитого белка с помощью мягкого кислотного гидролиза [8].

Замену терминирующих кодонов TAATGA на кодоны GATCCG осуществили с помощью олигонуклеотид-направленного мутагенеза [9]. Для этого 27-членный олигонуклеотид структуры CTTGGCTGCAGCGGATCTGGTTCGACGG, а также универсальный праймер для секвенирования структуры GTAАААСGACGGCCAGT отжигали с одноцепочечной ДНК фага *M13*Анг, вторую цепь гетеродуплекса достраивали большим фрагментом ДНК-полимеразы I *E. coli*, гетеродуплексами трансфицировали клетки *E. coli JM103*. После трансфекции на индикаторном газоне *JM103* образовались 604 белые бляшки и 6 синих. В контрольном эксперименте (без мутагенизирующего олигонуклеотида) все бляшки (10<sup>4</sup>) были белыми. Анализ первичной структуры ДНК фагов, размноженных из синих бляшек, показал, что замена нуклеотидов произошла в соответствии с запланированной схемой (рис. 1). Полученный фаг с заменой TAATGA → GATCCG назвали *M1-1*. Фаг *M1-1* формировал синие бляшки на индикаторном газоне *E. coli JM103*.

На электрофореграмме суммарных клеточных белков *E. coli*, инфицированных *M1-1*, не удалось обнаружить полос, соответствующих слитому белку, что свидетельствует о невысоком уровне экспрессии этого белка в *E. coli*. В то же время возможность оценить количество слитого белка ангиогенин — α-пептид по тесту комплементации с ΔM15β-галактозидазой позволяет рассмотреть изменение количества слитого белка в разных фазах роста клеточной культуры, инфицированной *M1-1*. Как отмечалось выше, β-галактозидазная активность клеточных экстрактов, содержащих α-донор, в условиях избытка ΔM15β-галактозидазы отражает количество α-комплементирующего белка. Результаты изме-

-  - ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК, КОДИРУЮЩАЯ АНГИОГЕНИН
-  - ГЕН lac Z'
-  - ВЕКТОРНАЯ ДНК

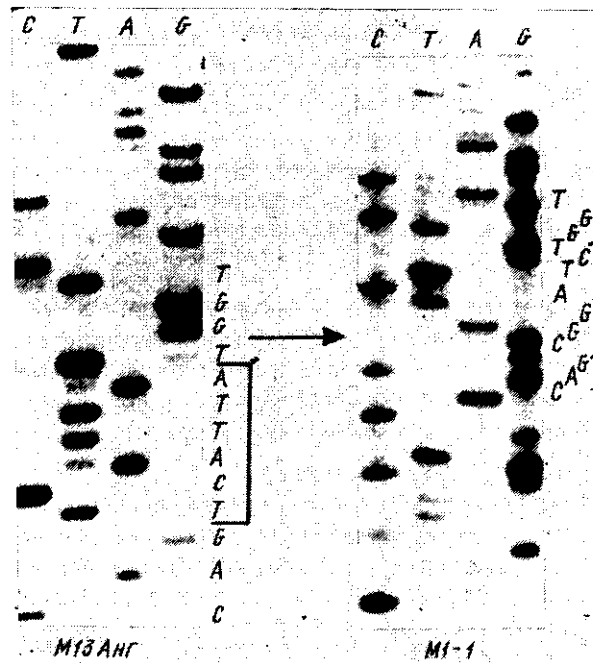
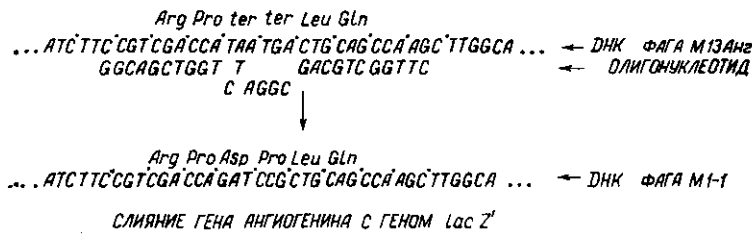
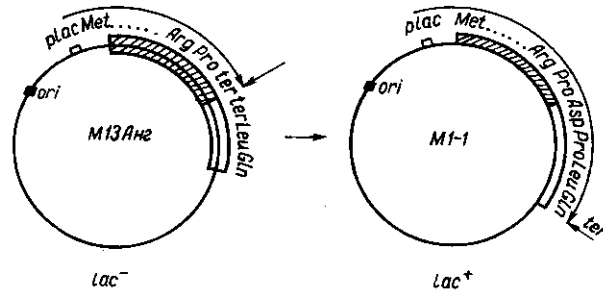


Рис. 1. Схема введения олигонуклеотид-направленной мутации в ДНК фага M13Ang для получения единой трансляционной рамки ангиогенин—N-концевой фрагмент β-галактозидазы. Приведены фрагменты секвенирующего геля, демонстрирующие происшедшую замену

Fig. 1. Oligonucleotide-directed mutation was introduced in M13Ang phage to obtain a single reading frame of angiogenin-N-terminal fragment of β-galactosidase. Fragments of sequencing gel are presented to demonstrate the mutation occurred

рения активности β-галактозидазы в экстрактах клеток при добавлении избытков ΔM15β-галактозидазы на разных стадиях роста клеточной культуры *E. coli JM103*, инфицированной M1-1, приведены на рис. 2, а. Видно, что количества белка, способного быть α-донором, возрастают

с увеличением плотности культуры, а на ранних фазах роста *E. coli* — с увеличением множественности инфекции фагом. Возрастание количества  $\alpha$ -донора в первые часы после индукции сменяется уменьшением (по-видимому, вследствие протеолиза)  $\alpha$ -комплементирующего белка в стационарной фазе роста. Увеличением множественности фага можно добиться некоторого повышения количества  $\alpha$ -донора на ранних этапах роста *E. coli*. Однако в целом количества исследуемого белка столь незначительны, что не обнаруживаются гель-электрофорезом суммарных

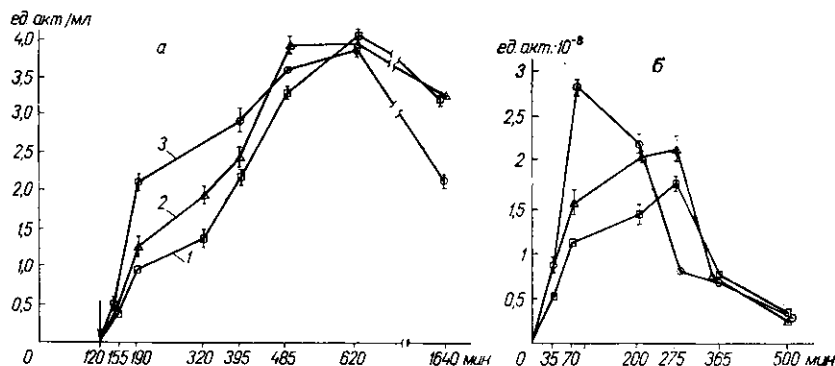


Рис. 2. Динамика изменения количества  $\alpha$ -комплементирующих белков в *M1-1*-инфицированной культуре *E. coli* при различной множественности заражения фагом (а) и то же в пересчете на единичную клетку *E. coli* (б): а — по оси абсцисс — время от начала инфекции, стрелкой отмечено введение в среду индуктора *lac*-оперона ИПТГ; по оси ординат — активность  $\beta$ -галактозидазы в 1 мл клеточной суспензии в условиях избытка  $\Delta M15$   $\beta$ -галактозидазы; б — по оси абсцисс — время после индукции *lac*-оперона; по оси ординат — то же, что а в пересчете на единичную клетку. Множественность заражения фагом: 1 — 100; 2 — 250; 3 — 500

Fig. 2. Dynamics of changes in the  $\alpha$ -complementary proteins amounts during the *M1-1* infected *E. coli* growth. X axis—time after infection, induction of *lac*-operon by IPTG indicated by arrow. Y axis —  $\beta$ -galactosidase activity in 1 ml of cell suspension in the excess of  $\Delta M15$   $\beta$ -galactosidase (a); dynamics of changes in the  $\alpha$ -complementary proteins amounts per a single cell. X axis—time after *lac*-operon induction. Y axis —  $\beta$ -galactosidase activity per a single cell in the  $\Delta M15$   $\beta$ -galactosidase excess (b). Multiplicity of infection: 1 — 100, 2 — 250, 3 — 500

белков *M1-1*-инфицированной *E. coli* даже при оптимизации множественности заражения в момент максимального количества  $\alpha$ -донора в клетке (множественность заражения — 500, время после индукции — 70 мин). Принимая во внимание, что в наиболее чистых препаратах  $\beta$ -галактозидазы *E. coli* удельная активность не превышает 1000 ед. акт. на 1 мг белка [10], можно оценить и абсолютные количества белка с  $\alpha$ -донорской активностью в экстрактах *E. coli*, инфицированных фагом *M1-1*. Действительно, измеряемая активность  $\beta$ -галактозидазы через 4 ч после индукции составляет 1,8 ед. акт., что соответствует  $\sim 1,8$  мкг  $\beta$ -галактозидазы. Учитывая, что молекулярная масса  $\beta$ -галактозидазы в 4,1 раза больше, чем слитого белка (ангиогенин— $\alpha$ -пептид), при условии участия всех имеющихся молекул слитого белка в  $\alpha$ -комплементации, количество  $\alpha$ -донора можно оценить как  $\sim 0,45$  мкг в 1 мл клеточной суспензии. Это составляет менее 0,1 % суммарных белков клетки. Понятно, что такие количества слитого белка могут маскироваться другими белками на электрофореграммах суммарных клеточных лизатов.

Таким образом, используемая схема позволяет оценивать количества белка в клетке даже в том случае, когда отсутствуют методы его функциональной детекции, необходимые антитела недоступны, а электрофоретический анализ суммарных белков клетки не позволяет выявить этот белок из-за незначительных количеств. Введение сайта химического расщепления белка между полипептидами, соответствующими ангиогенину и  $\alpha$ -пептиду, предполагает возможность избавиться от маркера после очистки химерного белка. Несмотря на то, что об универсальности данной схемы говорить, по-видимому, еще рано,  $\alpha$ -донор-

ская активность  $\alpha$ -пептида, слитого с интерфероном [4], фрагментом белка *A* [1], белком фага  $\phi X174$  [2] и рядом других белков [3, 5], дает основание предположить достаточно широкие возможности применения использованной нами методологии для детекции самых различных про- и эукариотических генноинженерных белков при экспрессии их в *E. coli*. Пример с ангиогенином, описанный в данной статье, — еще одно тому подтверждение. Оценка количества слитого белка в *M1-1*-инфицированных клетках показала, что сама по себе система *E. coli*/фаг *M13* с геном ангиогенин —  $\alpha$ -пептид под регуляцией *lac*-оперона дает незначительный уровень экспрессии, мало изменяющийся в процессе роста культуры и с варьированием множественности инфекции. Однако использование слитого белка ангиогенин —  $\alpha$ -пептид несомненно может значительно упростить выбор оптимальной системы экспрессии ангиогенина в *E. coli*.

EXPRESSION IN ESCHERICHIA COLI OF THE HUMAN ANGIOGENIN GENE TRANSLATIONALLY FUSED WITH THE N-TERMINAL FRAGMENT OF  $\beta$ -GALACTOSIDASE

S. P. Kovalenko, N. P. Mervetsov

Institute of Bioorganic Chemistry,  
Siberian Branch of Academy of Sciences of the USSR,  
Institute of Therapy,  
Siberian Branch of Medical Sciences of the USSR

Summary

The phage *M13mp8* carrying a DNA fragment coding for fusion protein angiogenin- $\alpha$ -peptide of  $\beta$ -galactosidase was obtained by oligonucleotide directed mutagenesis technique from the *M13mp8* phage with a cloned synthetic human angiogenin gene. The synthesis of peptide with  $\alpha$ -donor activity in the phage *M1-1*-infected cells was demonstrated. The amount of the fusion protein was estimated at the different stages of *E. coli* cell growth after the phage infection.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A gene fusion system for generating antibodies against short peptides / B. Löwenadler, B. Jansson, S. Palens et al. // *Gene*.— 1987.— 58, N 1.— P. 87—97.
2. Struck D. K., Maratea D., Young R. Purification of hybrid  $\beta$ -galactosidase proteins encoded by  $\phi X174E lacZ$  and *E. coli prlA lacZ*: a general method for the isolation of *lacZ* fusion polypeptides produced in low amounts // *J. Mol. and Appl. Genet.*— 1985.— 3, N 1.— P. 18—25.
3. Патон Е. Б., Живолуп А. Н. Химерный ген *гroc'* — *lacZ'* рекомбинантной плазмиды *pUC19*, сохраняющей  $\beta$ -галактозидазную активность в клетках *Escherichia coli* // Биополимеры и клетка.— 1987.— 3, № 5.— С. 276—279.
4. Экспрессия в *Escherichia coli* гена лейкоцитарного  $\alpha$ -2-интерферона человека, трансляционно слитого с N-концевым фрагментом  $\beta$ -галактозидазы / В. А. Петренко, С. И. Татьков, Л. Н. Семенова и др. // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.— 1988.— 4, № 1.— С. 37—41.
5. Close T. J., Christmann J. L., Rodriquer R. L. *M13* bacteriophage and *pUC* plasmids containing DNA inserts but still capable of  $\beta$ -galactosidase  $\alpha$ -complementation // *Gene*.— 1985.— 33, N 1.— P. 131—136.
6. Molecular basis of  $\beta$ -galactosidase  $\alpha$ -complementation / K. E. Langley, M. R. Villarejo, A. V. Fowler et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1975.— 72, N 4.— P. 1254.
7. Химико-ферментативный синтез и клонирование гена ангиогенина человека в составе фага *M13mp8* / С. П. Коваленко, В. В. Горн, В. А. Каргинов и др. // Биоорг. химия.— 1988.— 14, № 7.— С. 910—915.
8. Landon M. Cleavage at aspartyl-prolyl bonds // *Meth. Enzymol.*— 1977.— 47.— P. 145—149.
9. *EMBO/EMBL* summer course on site directed mutagenesis: Lab. manual.— Heidelberg, 1984.— 59 p.
10. *Sigma* Company Chemical Catalog.— 1989.— 631 p.
11. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.— М.: Мир, 1976.— 486 с.

Ин-т биоорг. химии Сиб. отд-ния АН СССР, Новосибирск  
Ин-т терапии Сиб. отд-ния АМН СССР, Новосибирск

Получено 23.08.89