



УДК 577.218

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ГИБРИДНОЙ β -ЛАКТАМАЗЫ
pBR322 с С-КОНЦЕВЫМ ФРАГМЕНТОМ, СОДЕРЖАЩИМ
ТАФТСИН (Thr-Lys-Pro-Arg)*

Загребельный С. Н., Закабуни А. И., Коржов В. А.,
Меламед Н. В., Смирнова О. Ю., Федосов С. А.

Научно-исследовательский конструкторско-технологический институт
биологически активных веществ, г. Бердск Новосибирской обл.

Проведена встройка кодирующего тафтсин фрагмента ДНК в ген β -лактамазы pBR 322 по сайту *Pst* I. Изучена экспрессия гена гибридной β -лактамазы и секреция продукта экспрессии в периплазму. Показано, что радиоактивный химерный белок секретируется в периплазматическое пространство миниклеток *E. coli* χ 925, обеспечивая транспорт тафтсина. После расщепления бромцианом тафтсин выделяли с использованием ионообменной и тонкослойной хроматографии.

В связи с решением задач генетической инженерии большое внимание уделяется изучению секреции белков *E. coli*. Транспорт чужеродных белков из цитоплазмы в периплазматическое пространство с помощью секреторного аппарата бактерии может значительно облегчить их выделение и очистку. Кроме того, в периплазме локализована только часть известных в настоящее время протеиназ *E. coli* [2], поэтому можно ожидать, что секретируемый белок будет в меньшей степени подвергаться протеолитической деградаци [3]. Известно, что клетки *E. coli* секретируют в периплазму ряд белков, одним из которых является β -лактамаза, кодируемая геном *bla* плазмиды pBR 322. В литературе приведены примеры использования β -лактамазы для изучения механизма секреции и создания секретируемых химерных белков. Результаты исследований, однако, достаточно разноречивы: описаны случаи как эффективного транспорта химерных белков [4], так и отсутствия их секреции [5, 6]. В работе [7] отмечено протекание процессинга гибридного белка, но не его транспорт. Имеются также данные об отсутствии в периплазме укороченной с С-конца β -лактамазы [8]. Вероятно, все эти результаты являются отражением достаточно жестких требований посттрансляционного механизма транслокации и процессинга β -лактамазы [9] к конформационным состояниям химерных белков.

Нами исследована возможность секреции в периплазму химерной β -лактамазы, содержащей в качестве С-концевого фрагмента тетрапептид тафтсин, Thr-Lys-Pro-Arg (предварительное сообщение см. [1]). Кодирующую химерный белок рекомбинантную ДНК получали встройкой синтетического гена тафтсина в *Pst*I-сайт плазмиды pBR322 по схеме, приведенной на рис. 1 (см. также «Экспериментальную часть»). Одна из плазмидных ДНК, выделенных из проявляющих фенотип Ar^sTc^r трансформированных клеток *E. coli* НВ101 и содержащая, по данным рестрикционного анализа, вставку нужного размера в правильной ориентации, была секвенирована (рис. 2). Первичная структура рекомбинантной ДНК pLT1 в месте встройки синтетического фрагмента точно соответствовала ожидаемой.

Изучение экспрессии плазмиды pLT1 и секреции химерной β -лактамазы проводили с использованием миниклеток *E. coli* χ 925. Среди меченых в присутствии [^{35}S]метионина продуктов экспрессии плазмиды pBR322 после электрофореза в полиакриламидном геле были обнаруже-

* Предварительное сообщение см. [1].

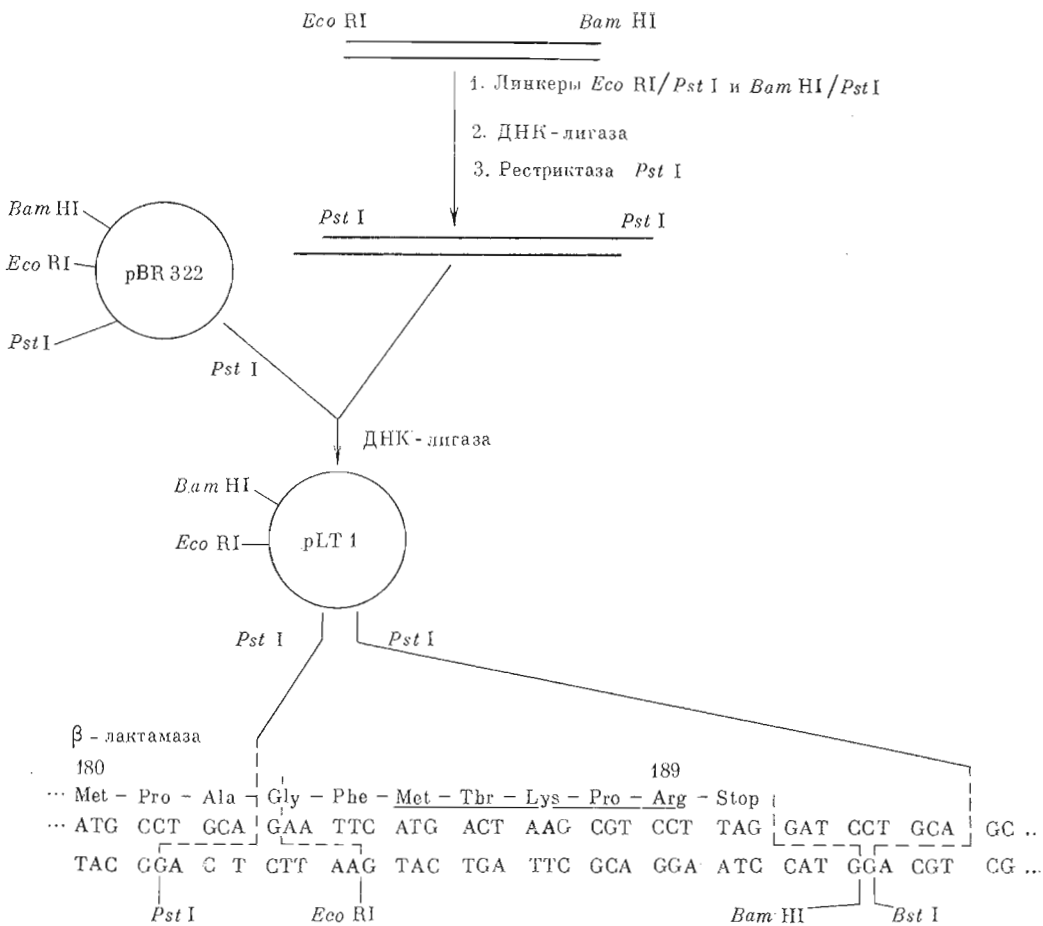


Рис. 1. Схема получения плазмиды pLT1 и частичная нуклеотидная последовательность рекомбинантной ДНК в месте встройки синтетического фрагмента. В аминокислотной последовательности подчеркнут участок, кодируемый встроенным фрагментом

ны предшественник и зрелая форма β -лактамазы (рис. 3). Среди кодируемых pLT1 продуктов в сферопластах микробных клеток были обнаружены два близко расположенных радиоактивных белка, один из которых имел подвижность, близкую к подвижности предшественника β -лактамазы pBR322. По-видимому, этот белок синтезируется в результате неполной термминации трансляции на кодоне UAG мРНК и является предшественником фермента, у которого между звеньями 182 и 183 появляется вставка из 11 дополнительных аминокислот. Эта вставка приводит к структурным изменениям, которые препятствуют процессингу и секреции белка — в периплазме микробных клеток не было обнаружено белка с электрофоретической подвижностью, близкой к подвижности β -лактамазы (см. рис. 3).

В микробных клетках, содержащих плазмиду pLT1, был также обнаружен белок с молекулярной массой 21 000 и два белка с близкой электрофоретической подвижностью и молекулярной массой \sim 18 000 (см. рис. 3). Эти значения молекулярных масс соответствовали рассчитанным для предшественника и зрелой формы химерной β -лактамазы, биосинтез которой терминируется кодоном UAG. Обнаружение белка, соответствующего зрелой форме химерного белка, предполагает процессинг укороченной β -лактамазы, приводящий к отщеплению сигнального пептида. Для выяснения взаимосвязи между наблюдаемым процессингом и секрецией гибридного белка было изучено распределение кодируемых плазмидными белками в сферопластах и в периплазме микробных клеток, подвергнутых осмотическому шоку. Среди белков периплазмы в случае pBR322 обнаружи-

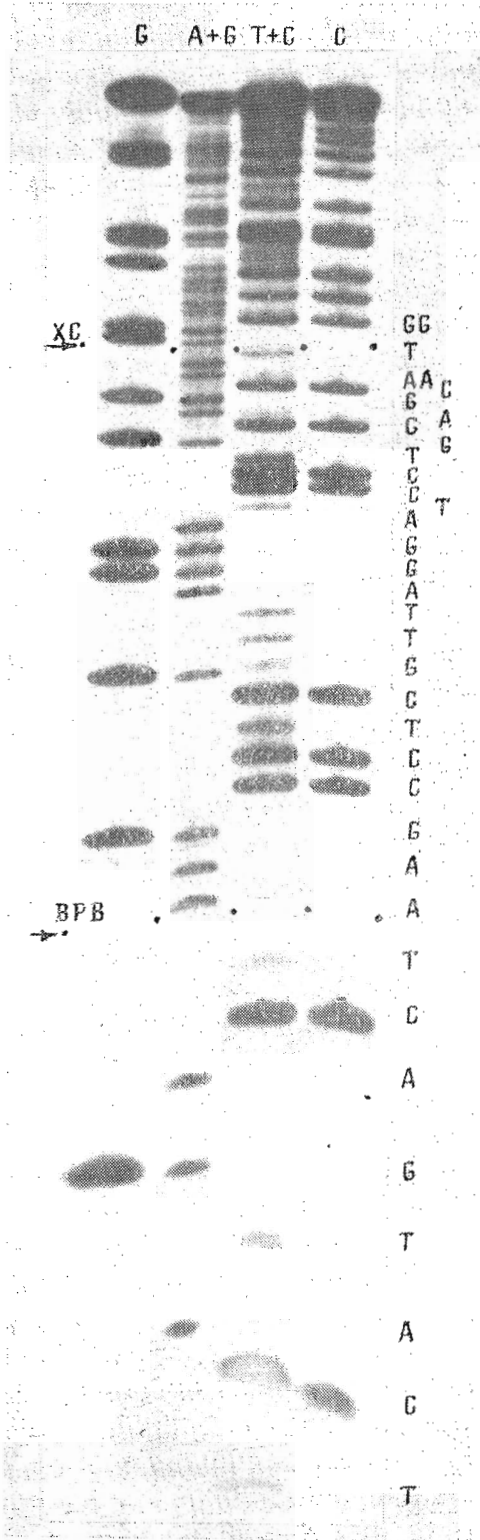


Рис. 2

Рис. 2. Секвенирующий гель значащей цепи гена β -лактамазы в месте встройки гена тафтсина. Точками обозначено положение красителей: ксиленианола FF (XC) и бромфенолового синего (BPB)

Рис. 3. Результаты электрофоретического разделения белков миниклеток *E. coli* χ 925, кодируемых плазмидами pBR322 (1 и 3) и pLT1 (2 и 4): 1 и 2 — белки, локализованные в сферопластах; 3 и 4 — белки, локализованные в периплазме

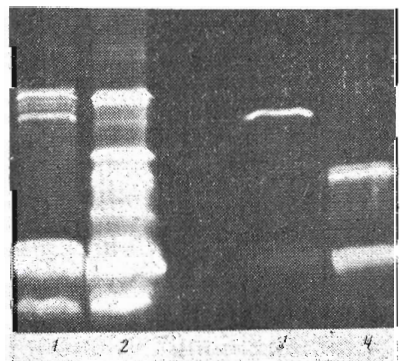


Рис. 3

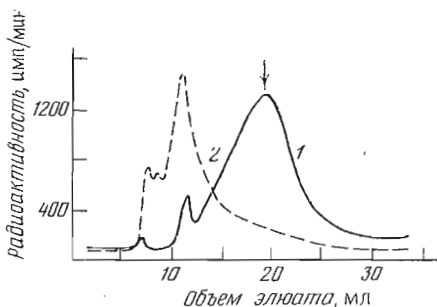


Рис. 4

Рис. 4. Разделение на SP-сефадексе С-25 (колонка 0,5×10 см) продуктов бромцианового расщепления белков, локализованных в сферопластах миниклеток *E. coli* χ 925 и кодируемых плазмидами рLT1 (1) и рBR322 (2). Стрелкой указано положение пика тафтсина

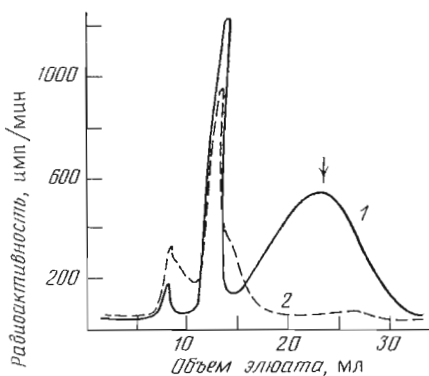


Рис. 5

Рис. 5. Разделение на SP-сефадексе С-25 (колонка 0,5×10 см) продуктов бромцианового расщепления белков, локализованных в периплазме миниклеток *E. coli* χ 925 (обозначения те же, что и в рис. 4)

валась только зрелая форма β -лактамазы, в то время как среди продуктов экспрессии рLT1 в периплазматическое пространство секретировались два полипептида с молекулярной массой, близкой к рассчитанной для процессированного химерного белка, а также низкомолекулярный материал, природа которого не исследовалась. Сопоставление радиоактивности процессированных форм химерного белка, обнаруживаемых в сферопластах и в периплазме, показало, что в периплазму его секретировалось до 30%.

Для выяснения вопроса о том, специфичен ли транспорт и не связан ли он с частичным повреждением сферопластов при осмотическом шоке, было определено содержание в периплазме β -галактозидазы — фермента, локализованного в цитоплазме *E. coli*. Как показали результаты анализа, в периплазме обнаруживалась β -галактозидаза в количестве не более 5% общего ее содержания в клетках. Следовательно, выход химерной β -лактамазы в периплазматическое пространство может рассматриваться как специфический процесс секреции. Обнаружение при гель-электрофорезе периплазматических белков двух продуктов, биосинтез которых определялся плазмидой рLT1, может быть связано или с ограниченным протеолизом гибридного белка, или же с существованием двух конформационных состояний при денатурации, как это было отмечено в случае нативного фермента [10].

Определение тафтсина в составе химерного белка проводили после расщепления BгCN белков периплазмы и сферопластов, меченных смесью [14 C]аминокислот. После удаления полипептидов с высокой молекулярной массой осаждением трихлоруксусной кислотой продукты расщепления разделили хроматографией на SP-сефадексе. Хроматографию во всех случаях проводили в присутствии маркера — синтетического тафтсина, выход которого регистрировали по УФ-поглощению при 220 нм. Радиоактивный материал в зоне выхода тафтсина обнаруживался только среди продуктов расщепления белков, кодируемых рекомбинантной ДНК, но не рBR322 (рис. 4 и 5). Анализ методом ТСХ меченого пептида, элюирующегося совместно с маркерным тафтсином, показал, что оба вещества имеют одинаковую подвижность. Полученные данные свидетельствуют, что химерная β -лактамаза, содержащая 189 аминокислот, не только достаточно устойчива к протеолизу, но и секретировалась в периплазму, обеспечивая транспорт основного тетрапептида тафтсина.

Таким образом, получена рекомбинантная ДНК, кодирующая химерный белок, состоящий из 189 аминокислот и содержащий фрагмент β -лактамазы рBR322 и основной тетрапептид — тафтсин. Химерный белок в

клетках *E. coli* процессируется и секретируется, обеспечивая транспорт целевого пептида в периплазматическое пространство. После расщепления секретированного белка бромцианом тафтсин может быть выделен хроматографией.

Экспериментальная часть

В работе использовали рестриктазы *EcoRI* (КФ 3.1.23.13), *BspRI* (КФ 3.1.23.17), *AluI* (КФ 3.1.23.4), *PstI* (КФ 3.1.23.31), ДНК-лигазу Т4 (КФ 6.5.1.1.), полинуклеотидкиназу Т4 (КФ 2.7.1.78), синтетический ген тафтсина, линкеры *EcoRI-PstI*, *BamHI-PstI*, *o*-нитрофенил- β -*D*-галактозид, полученные в нашем институте, [γ -³²P]АТФ, [³⁵S]метионин, смесь [¹⁴C]аминокислот фирмы Amersham (Великобритания), ионообменную бумагу DE-81 Whatman (Великобритания).

Выделение плазмид из клеток проводили по методу [11], трансформацию — по [12]. Выращивание клеток *E. coli* HB101 осуществляли на среде LB, содержащей ампициллин (50 мкг/мл) и тетрациклин (20 мкг/мл) или только тетрациклин в зависимости от использованной для трансформации плазмиды.

Получение плазмиды pLT1. Синтетический ген тафтсина (0,5 мкг), фланкированный сайтами рестрикции *EcoRI* и *BamHI*, и линкеры *EcoRI-PstI* и *BamHI-PstI* (по 1 мкг) фосфорилировали полинуклеотидкиназой в присутствии [γ -³²P]АТФ и затем лигировали. Лигазную смесь обрабатывали эндонуклеазой *PstI*, продукты гидролиза разделяли электрофорезом в 20% полиакриламидном геле. Ген из геля выделяли электроолюцией по методике [13] и использовали для лигирования с плазмидой pBR322, гидролизованной рестриктазой *PstI*. Реакционной смесью трансформировали клетки *E. coli* HB101 и отбирали трансформанты Ar^rTc^r. ДНК из колоний анализировали на размер вставки и правильность ее ориентации гидролизом эндонуклеазой *BspRI* и совместным гидролизом рестриктазами *AluI* и *EcoRI*. Анализ нуклеотидной последовательности проводили методом Максама — Гилберта [14].

Экспрессию плазмидных ДНК исследовали в миниклетках *E. coli*. Продуктирующей миниклетки штамм *E. coli* χ 925 [15] трансформировали плазмидами pBR322 и pLT1. Миниклетки выделяли из ночной культуры в градиенте сахарозы, затем инкубировали в присутствии [³⁵S]метионина или смеси [¹⁴C]аминокислот. Осмотический шок проводили согласно работе [16]. Белки периплазмы и лизированных сферопластов разделяли в 14% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях [17] с последующей флуорографией [18].

Расщепление ¹⁴C-меченых белков бромцианом и разделение образующихся продуктов проводили на SP-сефадексе С-25 (Pharmacia, Швеция) по способу [19]. Для дальнейшего анализа использовали ТСХ на пластинах Kieselgel 60F 254 (Merck, ФРГ) в системе PrⁿOH — Р_у — AcOH — Н₂O (10:5:4:4) [20] и флуорографию пластин по методике [21].

Активность β -галактозидазы определяли в условиях [22], используя в качестве субстрата *o*-нитрофенил- β -*D*-галактозид.

ЛИТЕРАТУРА

1. Загребельный С. Н., Закабунин А. И., Коржов В. А., Меламед Н. В., Смирнова О. Ю., Федосов С. А. В сб.: Материалы IX Всес. конф. «Гибридные плазмиды и экспрессия плазмидных генов». М., 1984, с. 30–31.
2. Swamy K. H. S., Goldberg A. L. J. Bacteriol., 1982, v. 149, № 4, p. 1027–1033.
3. Talmadge K., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 6, p. 1830–1833.
4. Villa-Komaroff L., Efstratiadis A., Broome S., Lomedico P., Tizard R., Nabez S. P., Chick W. L., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 8, p. 3727–3731.
5. Kadonaga J. K., Gantier A. E., Straus D. R., Charles A. D., Elde M. D., Knowles J. R. J. Biol. Chem., 1984, v. 259, № 4, p. 2149–2154.
6. Seeburg R. H., Shine J., Martial J. A., Ivarie R. D., Morris J. A., Ullrich A., Baxter J. D., Goodman H. M. Nature, 1978, v. 276, № 5690, p. 795–798.
7. Masamori S., Shin-Ichiro S., Akira H., Tsutomu N., Ken-Ichi M., Shinji W., Tet-suo M., Fusakazu M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 8, p. 2475–2479.
8. Koshland D., Botstein D. Cell, 1980, v. 20, № 2, p. 749–760.
9. Koshland D., Botstein D. Cell, 1982, v. 30, № 3, p. 893–902.
10. Pollitt S., Zalkin H. J. Bacteriol., 1983, v. 153, № 1, p. 27–32.
11. Birnboim H. C., Doly J. Nucl. Acids Res., 1979, v. 7, № 6, p. 1513–1523.

12. Himeno M., Shibata T., Kawahara J., Hanaoka Y., Komano T. *Agric. Biol. Chem.*, 1984, v. 48, № 3, p. 657-662.
13. Dzetzen G., Bellard M., Sassone-Cozzi P., Chambon P. *Anal. Biochem.*, 1981, v. 112, № 2, p. 295-302.
14. Maxam A., Gilbert W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, № 1, p. 560-571.
15. Fraser A., Curtiss R. In: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*/Ed. Hofschneider P. Berlin: Springer-Verlag, 1975, v. 69, p. 1-84.
16. Neu H., Heppel L. J. *Biol. Chem.*, 1965, v. 240, № 9, p. 3685-3692.
17. Laemmli U. *Nature*, 1970, v. 227, № 2316, p. 680-686.
18. Laskey R., Weels A. *Eur. J. Biochem.*, 1975, v. 56, № 2, p. 385-389.
19. Tanaka S., Oshima T., Ohsue K., Ono T. *Nucl. Acids Res.*, 1982, v. 10, № 5, p. 1741-1749.
20. Самойлов И. А., Андреев С. М., Галкин О. М. *Биооргани. химия*, 1981, т. 7, № 10, с. 1627-1632.
21. Осгерман Л. А. Исследование биологических макромолекул иммунофорезом и изотопными методами. М.: Наука, 1983, с. 227-228.
22. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976, с. 324.

Поступила в редакцию
18.XII.1985
После доработки
3.III.1986

GENE EXPRESSION STUDY ON HYBRID pBR322 β -LACTAMASE WITH A C-TERMINAL FRAGMENT CONTAINING TUFTSIN (Thr-Lys-Pro-Arg)

ZAGREBEL'NY S. N., ZAKABUNIN A. I., KORZHOV V. A., MELAMED N. V.,
SMIRNOVA O. Yu., FEDOSOV S. A.

*Research Design and Technology Institute of Biologically Active
Substances, Berdsk, Novosibirsk Region*

A hybrid β -lactamase gene with a synthetic tuftsins-coding DNA fragment inserted at the *Pst* I-site of pBR322 plasmid has been obtained and its expression has been studied. Radioactive amino acids have been used to show that in *E. coli* χ 925 minicells up to 30% of newly synthesized chimeric protein is secreted into periplasm providing the tuftsins transport. After hybrid protein cleavage with CNBr, tuftsins has been isolated using ion-exchange and thin-layer chromatography.