



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.213.7:577.152.34

**ВЕКТОР, СОДЕРЖАЩИЙ СИГНАЛ ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОГО
РАСЩЕПЛЕНИЯ ХИМЕРНЫХ БЕЛКОВ.
ПОЛУЧЕНИЕ [Leu⁵]ЭНКЕФАЛИНА С ПОМОЩЬЮ
ЭНТЕРОПЕПТИДАЗЫ**

*Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф., Филиппов С. А.,
Чувпило С. А., Коробко В. Г., Воротынцева Т. И.*,
Бессмертная Л. Я.*, Михайлова А. Г.*, Америк А. Ю.*,
Антонов В. К.**

*Лаборатория химии генов и * Лаборатория химии
протеолитических ферментов,*

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва

К настоящему времени в литературе нет примеров получения удовлетворительного уровня прямой экспрессии в *E. coli* генов, кодирующих пептиды и небольшие белки, по-видимому, вследствие быстрой деградации этих продуктов бактериальными пептидазами. Одним из наиболее удачных подходов, позволяющих успешно решать проблему экспрессии пептидов, является конструирование гибридных генов, в которых гетерологичные нуклеотидные последовательности соединены без нарушения рамки считывания с бактериальным геном, например с геном β -галактозидазы. Именно такой подход был разработан сначала для экспрессии гена соматостатина [1] и затем с успехом использован для экспрессии ряда других пептидов [2–4]. Однако описанный выше подход обладает существенным недостатком, обусловленным тем, что в белковой химере целевой пептид присоединен к белку-«носителю» через метиониновый остаток. Это делает его непригодным для экспрессии генов пептидов, содержащих метионин, и приводит к ряду трудностей, связанных с разрушением «носителя» под действием бромциана.

Чтобы исключить эти недостатки, мы сконструировали плазмидный вектор рЕК1, который позволяет экспрессировать в виде химеры с β -галактозидазой пептиды и белки практически с любой заданной аминокислотной последовательностью. Вектор рЕК1 был получен путем клонирования в плазмиде рUR291 [5] по сайту *SalI* синтетического дуплекса (на рисунке выделен), который при правильной ориентации кодирует в рамке считывания β -галактозидазы пентапептид Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, узнаваемый энтеропептидазой (КФ 3.4.21.9) двенадцатиперстной кишки быка. Этот фермент расщепляет пептидную связь после остатка лизина узнаваемой последовательности [6–8]. Наличие сайта рестрикционной эндонуклеазы *KpnI* позволяет клонированием встык (после расщепления рЕК1 рестриктазой *KpnI* и экзонуклеазного удаления выступающих 3'-концов) двухцепочечную ДНК, кодирующую какую-либо аминокислотную последовательность, которую после выделения гибридного белка можно отщепить обработкой энтеропептидазой (ср. [8, 9]).

Для проверки возможности применения вектора рЕК1 для экспрессии гена химерного белка с последующим протеолитическим отщеплением целевого пептида мы осуществили химический синтез короткой двухцепочечной ДНК, кодирующей аминокислотную последовательность [Leu⁵]эн-

1020
 ... TrpCysArgGlyPheValAspAspAspAspLysValProSerThrCysSerProSerPhe...
 ... TGGTGTCTGGGGATCCGTCGATGACGACGATAAGGTACCGTCGACCTGCAGCCCAAGCTTA...
 ... ACCACAGCCCCTAGGCAGCTACTGCTGCTATTCCATGGCAGCTGGACGCTGGGTTTCGAAT...
 BamI KpnI SalI PstI HindIII

pEK1

1020
 ... TrpCysArgGlyPheValAspAspAspAspLysTyrGlyGlyPheLeuStop
 ... TGGTGTCTGGGGATCCGTCGATGACGACGATAAGTACGGTGGCTTTCTCTAAGCTTA...
 ... ACCACAGCCCCTAGGCAGCTACTGCTGCTATTCCATGCCACCGAAAGAGATTCCGAAT...
 BamI HindIII

pEK-ENK

Нуклеотидная последовательность рекомбинантных плазмид pEK1 и pEK-ENK. Клонированные олигонуклеотиды заключены в рамку. Место расщепления энтеропептидазой показано стрелкой. Подчеркнуты сайты узнавания соответствующих эндонуклеаз

кефалина, и ее направленное клонирование по затупленному сайту *Kpn*I и нормальному сайту *Hind*III в плазмиде pEK1. В результате была получена плаزمида pEK-ENK, в которой ген β -галактозидазы через энтеропептидазный линкер слит с геном [Leu⁵]энкефалина. Строение полученной плазмиды (рисунок) было подтверждено рестриктивным анализом и определением нуклеотидной последовательности вставки.

После трансформации плазмидой pEK-ENK клетки *E. coli* JM101 (Δ *lac*pro F' *I*^a *lac*z Δ M15) при индукции изопропилтио- β -D-галактопиранозидом способны экспрессировать химерный белок, причем его количество в клетках превышает 30% суммарного белка (по данным электрофореза в ПААГ).

Энтеропептидаза была получена из слизистой двенадцатиперстной кишки быка и очищена по видоизмененной методике [7]. Введение после кислотного осаждения примесных белков (при pH 5,4) стадии ультрафильтрации на фильтрах Amicon XM-100 и хроматографии на ионообменнике DEAE-Toyorearl 650M (вместо DEAE-целлюлозы DE-52) позволило получить фермент с удельной активностью 1600 ед./мг и общим выходом по активности 4%. Активность фермента определяли по активации трипсиногена с использованием *n*-нитроанилида бензоил-D,L-аргинина в качестве субстрата. Единице активности энтеропептидазы при определении по этому методу соответствует 825 ед. по методу [7]. Чистоту препарата энтеропептидазы контролировали электрофорезом в ПААГ (7%) в присутствии SDS и меркаптоэтанола. Полученный препарат не проявлял аминопептидазной активности при тестировании по *n*-нитроанилиду лейцина, однако в больших концентрациях (~50 ед./мл) расщеплял [Leu⁵]энкефалин ($1,7 \cdot 10^{-5}$ M, $\tau_{1/2}$ 6 ч). Это свидетельствовало о наличии следов посторонней пептидазы даже в столь высоко очищенном препарате. Пептидазная активность полностью подавлялась *o*-фенаптролином ($5 \cdot 10^{-4}$ M).

Для получения химерного белка клетки *E. coli* разрушали ультразвуком, центрифугировали (20 000 об./мин), супернатант фракционировали сульфатом аммония (37% насыщения) и после удаления солей гель-фильтрацией на сефадексе G-25 хроматографировали на DEAE-Toyorearl 650M в градиенте концентрации NaCl (0,2–0,35 M). Последующая гель-фильтрация в отсутствие солей магния приводила к практически гомогенному белку, лишенному β -галактозидазной активности. Выход химерного белка,

считая на суммарный белок *E. coli*, составил около 20%. Его гомогенность проверялась ПААГ-электрофорезом в денатурирующих условиях и методом ВЭЖХ на колонке с гелем Ultragack TSK-G 2000SW. Этим последним методом проверяли также стабильность белка. Оказалось, что фракции белка, полученные элюированием с ионообменника 0,28–0,30 М NaCl, содержат примесные протеиназы, что приводит к деградации химерного белка за 5–6 ч инкубации (20°С) и к расщеплению [Leu⁵]энкефалина. Обе побочные активности полностью подавляются *o*-фенаントролином (1·10⁻⁵ М). Фракции химерного белка, полученные при элюции соевым раствором с 0,25–0,28 М NaCl, были полностью стабильны.

Для расщепления очищенного белка его инкубировали с энтеропептидазой при pH 7,8 и 37°С в буфере 0,05 М трис-HCl, содержащем 5·10⁻⁴ М *o*-фенаントролин, при молярном соотношении химерный белок – энтеропептидаза 90 : 1. После инкубации в течение 10 ч раствор выдерживали 3 мин при 100°С, фильтровали через фильтр GF/F и образовавшийся энкефалин определяли методом ВЭЖХ на колонке Ultrasphere ODS (25×0,46 см). Хроматографию проводили в градиенте концентрации ацетонитрила (0–90%) в 0,01 М аммоний-ацетатном буфере (pH 5,7). Колонку предварительно калибровали [Leu⁵]энкефалином (Serva). Выход целевого пептида составил 74%, считая на очищенный химерный белок.

Содержание [Leu⁵]энкефалина контролировали также радиорецепторным анализом [10] с использованием синаптических мембран мозга крысы. Этот метод и метод ВЭЖХ дали сходные результаты. Пептид, полученный расщеплением химерного белка, подвергали аминокислотному анализу. Полученные результаты (число остатков на 1 моль): Tyr – 0,9; Gly – 2,04; Phe – 0,95; Leu – 1,02 – хорошо совпадают с ожидаемыми.

Таким образом, сконструированный нами вектор pЕК1, кодирующий сигнал узнавания энтеропептидазы, позволяет с высоким выходом получать олигопептиды экспрессией гибридных генов в *E. coli*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Itakura K., Hirase T., Crea R., Riggs A. D., Heineker H. L., Bolivar F., Boyer H. W. Science, 1977, v. 198, p. 1065–1063.
2. Горобко В. Г., Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф., Северцова И. В., Чернов Б. К., Колосов М. Н., Городецкий С. И., Слюсаренко А. Г., Капелинская Т. В., Лисенков А. Ф., Дубинин Н. П. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 12, с. 1802–1815.
3. Свердлов Е. Д., Долганов Г. М., Монастырская Г. С., Ходкова Е. М., Честухин А. В., Шелякин М. Ф. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 7, с. 1112–1115.
4. Кумарев В. П., Ривкин М. И., Богачев Л. Е., Меркулов В. М., Рыбаков В. Н., Соленов Е. И., Федоров В. И. Докл. АН СССР, 1980, т. 252, № 6, с. 1506–1510.
5. Rüther U., Müller-Hill B. EMBO J., 1983, v. 2, № 10, p. 1791–1793.
6. Anderson L. E., Walsh K. A., Neurath H. Biochemistry, 1977, v. 16, № 15, p. 3354–3360.
7. Liepnicks J. J., Light A. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 5, p. 1677–1683.
8. Light A., Savithri H. S., Liepnicks J. J. Anal. Biochem., 1980, v. 106, № 2, p. 199–206.
9. Belguge R. M., Mayne N. G., Van Frank R. M., Rutter W. E. DNA, 1984, v. 3, № 1, p. 120.
10. Пороженко Н. В., Зайцев С. Е., Варфоломеев С. Д. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 7, с. 902–911.

Поступило в редакцию 30.IX.1986

PLASMID VECTOR CONTAINING A SIGNAL FOR SPECIFIC CLEAVAGE OF THE CHIMERIC PROTEINS. PREPARATION OF [Leu⁵] ENKEPHALIN WITH AID OF ENTEROPEPTIDASE

DOBRYNIN V. N., BOLDYREVA E. F., FILIPPOV S. A., CHUVPILLO S. A., KOROBU V. G., VOLOTYNTSEVA T. I., BESSMERFNAYA I. Ya., MIKHAILOVA A. G., AMERIK A. Yu., ANTONOV V. K.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A plasmid vector (pЕК1) coding, in framework of β -galactosidase gene, for the amino acid sequence (Asp)₂Lys which is recognized by bovine enteropeptidase has been constructed. Using this vector and chemically synthesized DNA coding for the [Leu⁵]enkephalin, a plasmid (pЕК-ENK) has been obtained in which the β -galactosidase gene is fused, through the enteropeptidase linker, with the gene for [Leu⁵]enkephalin. The chimeric protein produced by expression of this plasmid has been isolated and then cleaved by the enteropeptidase to give [Leu⁵]enkephalin with the yield 74%.