БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 14 * № 2 * 1988

УДК 547.963.32

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ В ВЕКТОРАХ НА ОСНОВЕ ГЕНОМА НИТЧАТЫХ ФАГОВ

Гуревич А. И., Некрасова О. В.

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

На примере гена лейкоцитарного интерферона α_2 изучена экспрессия генов, клонированных в нитчатых фагах (M13mp8, M13mp9) и в плазмидных векторах, содержащих регуляторные участки и лидерную последовательность гена основного белка оболочки нитчатых фагов (плазмиды pFPCP2 и pFPCP8).

Уровень экспрессии гена в бактериальной клетке определяется многими факторами на всех ступенях реализации генетической информации. Поэтому созданы и продолжают создаваться многочисленные векторные системы, используемые для клонирования и экспрессии генов при решении задач биотехнологии. Возможность эффективного получения полипептидного продукта из штамма-продуцента определяется не только свойствами вектора, но и характеристиками бактериальной клетки-хозяина. В связи с этим мы провели сравнительное изучение некоторых фаговых и плазмидных векторов в отношении экспрессии клонированного в них гена лейкоцитарного интерферона LIFα_2 в нескольких штаммах *E. coli* (HB101, JM103, SG20050).

Клонирование и экспрессия генов интерферонов, в том числе лейкоцитарных, в *E. coli* многократно описаны; при этом использовались как кДНК, так и искусственные гены, полученные химико-ферментативным синтезом [1—8]. В настоящей работе мы использовали искусственный ген LIFα_2, клонированный в рекомбинантной плазмиде pLeIFA$_1$SD, в которой его экспрессия находится под контролем промотора A_1 фага T7 (PA$_1$T7) и синтетического участка связывания рибосомы (SD) [9]. В исходной конструкции структурный ген LIFα_2 находился между сайтами рестриктаз *Bam*HI и *Sal*I, а перед промотором располагался сайт *Eco*RI (рис. 1).

Ранее высокий уровень экспрессии (выход белка 10^8 МЕ/л) гена LIFα_2, полученного из кДНК, был достигнут при клонировании в фаге M13mp7 под контролем lac-промотора [10]. В последнем случае в результате биосинтеза в индуцированной изопропилтио-β-*D*-галактозидом (IPTG) системе получался модифицированный белок, содержащий 19 дополнительных аминокислотных остатков на N-конце, который обладал той же, что и LIFα_2, удельной биологической активностью.

Мы встроили *Eco*RI/*Sal*I-фрагмент плазмиды pLeIFA$_1$SD между соответствующими сайтами фагов M13mp8 и M13mp9 и клонировали их в *E. coli* TG1. Отбор клонов с рекомбинантными фагами проводили на индикаторной среде, содержащей IPTG и 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-*D*-галактозид (X-Gal), по образованию бесцветных бляшек и подтверждали их структуру рестриктным анализом ДНК фагов (RF-формы).

При выращивании полученных культур *E. coli* с рекомбинантными фагами M13mp8LIFA$_1$SD и M13mp9LIFA$_1$SD (рис. 2) в отсутствие индуктора был достигнут выход интерферона α_2, примерно соответствующий описанному в работе [10] для индуцированной системы с lac-промотором, т. е. $\sim 10^6$ молекул на клетку (таблица) *. Наблюдаемый в обоих гибридных фагах одинаковый уровень экспрессии свидетельствует, что она про-

* Недавно в работе [7] такой же выход интерферона α_2 получен в системе фага M13mp8 под контролем промотора A_2 фага T7.

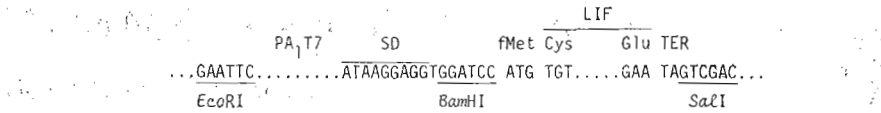

Рис. 1. Схема расположения регуляторных участков и структурного гена LIFα_2 в плазмиде pLeIFA$_1$SD

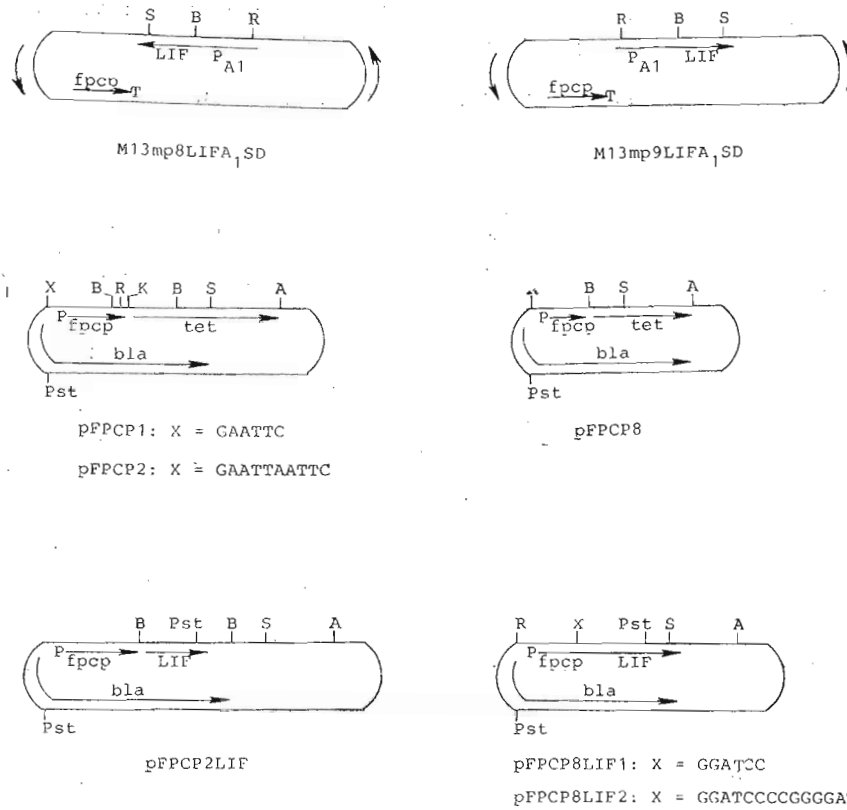

Рис. 2. Схематическое строение рекомбинантных фагов и плазмид. Указано расположение сайтов рестриктаз (R – *Eco*RI, K – *Kpn*I, B – *Bam*HI, S – *Sal*I, A – *Ava*I, *Pst* – *Pst*I), направление транскрипции генов и расположение промоторов (P) и терминатора (T)

текает независимо от направления транскрипции гена LIFα_2 относительно транскрипции генов фагового вектора.

Для изучения экспрессии гена LIFα_2 в плазмидных векторах мы выбрали полученные нами плазмиды pFPCP1 и pFPCP2 [11] (рис. 2). Для удобства клонирования мы сначала делетировали в плазмиде pFPCP1

Биосинтез интерферона в клетках *E. coli* с фагами и плазмидами

Плазмида (или фаг), продуцент интерферона	Штамм *E. coli* — хозяина	Выход интерферона	
		М. Е./л	молекула/клетка
M13mp8LIFA$_1$SD	JM103	10^7 *, **	$5\cdot10^5$
M13mp9LIFA$_1$SD	JM103	10^7 *	$5\cdot10^5$
pFPCP2LIF	HB101	10^5-10^6 **	$<10^4$
pFPCP2LIF	SG20050	10^5-10^6 **	$<10^4$
pFPCP8LIF2	HB101	10^9 **	$5\cdot10^7$
pFPCP8LIF2	SG20050	$2\cdot10^9$ **	10^8
pFPCP8LIF2	JM103	10^9 **	$5\cdot10^7$

* По величине защитной противовирусной активности; среднее из трех определений.
** По данным радиоиммуноанализа; среднее из трех определений.

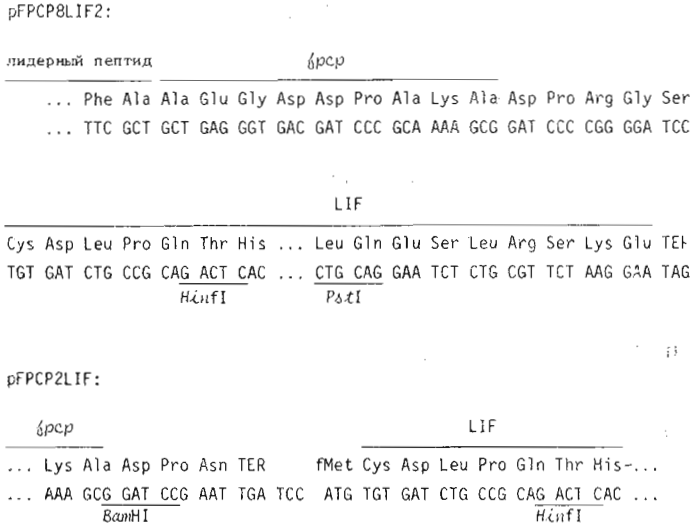

Рис. 3. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности вблизи стыка генов *fpcp* и LIFα_2 в рекомбинантных плазмидах

*Bam*HI-фрагмент, содержащий начало гена *tet*, превратив ее в Tc^s-плазмиду pFPCP8. Из этой плазмиды мы вырезали *Bam*HI/*Sal*I-фрагмент и в подготовленном таким образом векторе клонировали ген LIFα_2, который в свою очередь был вырезан из RF ДНК фага M13mp8LIFA$_1$SD с помощью рестриктаз *Bam*HI и *Sal*I. При этом образовалась плазмида pFPCP8LIF1, в которой, однако, рамки считывания генов *fpcp* и LIFα_2 не совпадали, и для восстановления единой рамки мы встроили в сайт *Bam*HI плазмиды pFPCP8LIF1 самокомплементарный синтетический адаптер dGATCCCCGGG. В результате была получена плазмида pFPCP8LIF2 (рис. 2). С другой стороны, мы клонировали *Bam*HI/*Sal*I-фрагмент с геном LIFα_2, в котором оба конца были затуплены ДНК-полимеразой А, в плазмиде pFPCP2, расщепленной *Eco*RI, с затупленными ДНК-полимеразой концами. При этом была получена плазмида pFPCP2LIF. Ориентация гена LIFα_2 в рекомбинантных плазмидах была определена с помощью рестриктазы *Pst*I, один из сайтов которой находится в гене *bla* векторов, а другой — вблизи конца синтетического гена LIFα_2, и структура плазмид pFPCP2LIF и pFPCP8LIF2 доказана секвенированием *Hin*fI/*Msp*I-фрагментов (рис. 3). В обеих плазмидах рамка считывания гена LIFα_2 совпадает с рамкой гена лидерного пептида в векторе. При этом плазмида pFPCP8LIF2 кодирует образование гибридного белка, включающего последовательность лидерного пептида и первых 9 аминокислот белка оболочки фага наряду с интерфероном α_2 (рис. 3). Возможность синтеза интерферона в плазмиде pFPCP2LIF определяется тем, что инициирующий кодон в гене LIFα_2 расположен вблизи терминирующего кодона TGA (вслед за частью гена *fpcp*, см. рис. 2 и 3), который в такой структуре, по-видимому, может служить частью сигнала реинициации трансляции [12].

Суммарные белки, выделенные после выращивания полученных культур *E. coli* с плазмидами (или инфицированных фагом), содержащими клонированный ген LIFα_2, анализировали с помощью гель-электрофореза, а также определяли в них содержание интерферона радиоиммунологическим методом или по защитной противовирусной активности (таблица).

Из приведенных в таблице данных следует, что образование интерферона в культуре с плазмидой pFPCP2LIF протекает менее эффективно по сравнению с инфицированной фагом M13mp8LIFA$_1$SD культурой. Таким образом, реинициация трансляции в системе, где вблизи терминирующего кодона UGA расположен инициирующий кодон AUG, происходит только в том случае, если трансляция предшествующего пептида

(в нашем случае fpcp) протекает достаточно эффективно. Следует отметить, что недавно тот же искусственный ген LIFα2 клонировали в плазмиде pIF6/8, в которой он был расположен вслед за регуляторными участками и почти полным структурным геном *fpcp*, а также дополнительной последовательностью, обеспечивавшей новый эффективный старт трансляции; в этой системе был достигнут очень высокий уровень экспрессии гена LIFα_2 (усиление на 2 порядка) [13].

В культурах с плазмидой pFPCP8LIF2 образуется гибридный белок fpcp-LIFα_2, сохраняющий активность интерферона, молекулярная масса которого, судя по электрофоретической подвижности, составляет ~22 000. Выход этого белка во всех использованных штаммах-продуцентах оказался намного выше выхода интерферона в других изученных нами системах (таблица) и приближался к выходу, достигнутому с отмеченной выше плазмидой pIF6/8 [13]. Это свидетельствует о меньшем уровне деградации белка, обладающего лидерной последовательностью, которая, вероятно, обусловливает эффективный перенос его в периплазматическое пространство. В то же время мы не обнаружили ни в одном из штаммов-продуцентов образования заметного количества претерпевшего процессинг гибридного белка с молекулярной массой 20 000. По-видимому, для эффективного отщепления лидерного пептида от гибридного белка нужны дополнительные структурные предпосылки.

Авторы выражают благодарность С. А. Чувпило (ИБХ АН СССР) за предоставление стандартного интерферона α_2 и его продуцента с плазмидой pLeIFA$_1$SD; А. С. Новохатскому (Институт вирусологии АМН СССР) за предоставление вируса везикулярного стоматита и культуры фибробластов человеческих эмбрионов; Т. И. Муравьевой и А. Ш. Вайсбергу (ИБХ АН СССР) за радионммунологическое определение активности интерферона, С. А. Филиппову (ИБХ АН СССР) за синтетический адаптер.

Экспериментальная часть

Использовали трис, акриламид, N,N′-метиленбисакриламид, персульфат аммония (Merck); N,N,N′,N′-тетраметилендиамин (Reanal); агарозу, ATP, dNTP, бромистый этидий, кумасси R250, X-Gal, IPTG (Sigma); мочевину, ос.ч., цезий хлористый, ос.ч. (Союзреактив); [γ-^{32}P]ATP, [α-^{32}P]dNTP (1500–2000 Ки/ммоль, Amersham); агар, триптон, дрожжевой экстракт (Difco); SDS (Serva); адаптер dGATCCCCGGG синтезирован С. А. Филипповым.

Т4-ДНК-лигаза (КФ 6.5.1.1), Т4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78), ДНК-полимераза А (КФ 2.7.7.7) и рестрикционные эндонуклеазы *Eco*RI, *Bam*HI и *Ava*I выделены и очищены как описано в работе [14]. Применяли рестрикционные эндонуклеазы (КФ 3.1.23.×) *Msp*I (Институт прикладной энзимологии, Вильнюс), *Kpn*I, *Hin*fI, *Sal*I (PL Biochemicals), *Pst*I (Miles).

Стандартные белки – набор MSH (Serva); интерферон α_2 (предоставлен С. А. Чувпило).

5′-Концевую метку вводили по методу [15], 3′-концевую метку – по методу [16]. Для секвенирования использовали частичную химическую деградацию твердофазным методом [17]. Электрофорез ДНК проводили в вертикальных пластинах ПААГ (5–10%) толщиной 0,4 мм в 50 мМ трис-боратном буфере, pH 8,3, или в горизонтальных пластинах 1% агарозного геля толщиной 2 мм в буфере (pH 8,0), содержащем 40 мМ трис-ацетат, 20 мМ Na-ацетат, 20 мМ NaCl и 1 мМ EDTA; SDS-электрофорез белков проводили по Лэммли [18] в вертикальном ПААГ (концентрирующий гель – 4%, разделяющий гель – 13%) толщиной 0,8 мм, гели красили кумасси R250 и после отмывки либо высушивали, либо определяли количество белка в вырезанной полосе по методу [19]. Радиоавтографы получали на рентгеновской пленке РМ-1, используя при низкой радиоактивности образцов усиливающие экраны ЭУ-В3 и повышение чувствительности пленки путем преэкспонирования по методу [20]. ДНК из агарозных гелей выделяли методом электроэлюции [21].

Встраивание клонируемых фрагментов с липкими концами проводили при 10° С (20 ч). Концентрации фрагмента и вектора составляли 0,1 и 0,05 пмоль/мкл соответственно, концентрация Т4-ДНК-лигазы 1 ед. акт./мкл. Встраивание клонируемых фрагментов с затупленными концами осуществляли при 22–23° С (20 ч) и концентрации лигазы 5 ед. акт./мкл.

Компетентные клетки *E. coli* готовили по методу [22] и хранили при –50° С. После трансформации клетки высевали на чашки с агаризованной индикаторной средой (40 мкг/мл X-Gal и 50 мкг/мл IPTG, трансформация рекомбинантными фагами M13mp8LIFA$_1$SD и M13mp9LIFA$_1$SD) или с агаризованной средой, содержащей

100 мкг/мл ампициллина (трансформация плазмидами pFPCP7, pFPCP7LIF и pFPCP2LIF).

Определение активности интерферона в лизатах культур *E. coli* TG1 с плазмидами или инфицированных рекомбинантными фагами проводили по подавлению цитопатического эффекта вируса везикулярного стоматита на культуре фибробластов человеческих эмбрионов по методу [23], а также радиоиммунологическим методом с помощью I^{125}-антител.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Nagata S., Manten N., Weissmann C.* // Nature. 1980. V. 287. № 5781. P. 401–408.
2. *Goeddel D. V., Yelverton E., Ulrich A., Heyneker H. L., Miozzari G., Holmes W., Seeburg P. H., Dull T., May L., Stebbing N., Crea R., Maeda S., McCandliss R., Sloma A., Tabor J. M., Gross M., Familetti P. C., Pestka S.* // Nature. 1980. V. 287. № 5781. P. 411–416.
3. *Edge M. D., Greene A. R., Heathcliffe G. R., Meacock P. A., Schuch W., Scanlon D. B., Atkinson T. C., Newton C. R., Markham A. F.* // Nature. 1981. V. 292. № 5825. P. 756–762.
4. *De Maeyer E., Skup D., Prasad K. S. N., De Maeyer-Guignard J., Williams B., Meacock P., Sharpe C., Pioli D., Hennam J., Schuch W., Atherton K.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 14. P. 4256–4259.
5. *Pestka S.* // Arch. Biochem. and Biophys. 1983. V. 221. № 1. P. 1–37.
6. *Ильичев А. А., Беликов С. И., Пугачев В. Г., Тимофеев И. В., Зорин В. В., Попов С. Г., Щелкунов С. Н., Сандахчиев Л. С.* // Молекул. генетика, микробиология и вирусология. 1986. № 7, С. 23–26.
7. *Ильичев А. А., Миненкова О. О., Беликов С. И., Тимофеев И. В., Пугачев В. Г., Каргинов В. А., Попов С. Г., Щелкунов С. Н., Зорин В. В., Сандахчиев Л. С.* // Молекул. генетика, микробиология и вирусология. 1986. № 8. С. 28–32.
8. *Щелкунов С. Н., Ильичев А. А., Красных В. Н., Тимофеев И. В., Рязанкин И. А., Ямщиков В. С., Попов С. Г.* // Биотехнология. 1987. Т. 3. № 2. С. 146–151.
9. *Чувпило С. А.* // Ранние промоторы бактериофага T7. Изучение и использование в генотехнике: Автореф. дис. на соиск. уч. ст. канд. хим. наук. М.: ИБХ АН СССР, 1984.
10. *Slocombe P., Easton A., Boseley P., Burke D. C.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 18. P. 5455–5459.
11. *Гуревич А. И., Некрасова О. В.* // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 2. С. 149–152.
12. *Atkins J. F.* // Nucl. Acids Res. 1979. V. 7. № 4. P. 1035–1041.
13. *Гилева И. П., Мизенко Г. А., Серпинский О. И., Аммосов А. Д., Кравченко В. В.* // Докл. АН СССР. 1986. Т. 288. № 3. С. 734–737.
14. *Гуревич А. И., Бабий И. И., Некрасова О. В., Черненькая Е. А., Колосов М. Н.* // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 10. С. 1356–1360.
15. *Махат А. М., Gilbert W.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 2. P. 560–564.
16. *Гуревич А. И., Аваков А. Э.* // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 2. С. 301–304.
17. *Чувпило С. А., Кравченко В. В.* // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 12. С. 1634–1637.
18. *Laemmli U. K.* // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
19. *Ball E. H.* // Anal. Biochem. 1986. V. 155. № 1. P. 23–27.
20. *Laskey R. A.* // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 363–371.
21. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* // Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 171–172.
22. *Morrison D. A.* // Meth. Enzymol. 1979. V. 68. P. 326–331.
23. *Armstrong J. A.* // Applied Microbiol. 1971. V. 21. № 4. P. 723–725.

Поступила в редакцию
17.VI.1987

EXPRESSION OF GENES CLONED INTO VEHICLES COMPRISING THE ELEMENTS OF FILAMENTOUS PHAGE GENOME

GUREVICH A. I., NEKRASOVA O. V.

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

Expression of the human leucocyte interferon α_2 gene has been studied, cloned into filamentous phages (M13mp8, M13mp9) and plasmid vehicles comprising the regulatory regions and signal sequence of the filamentous phage main coat protein gene (plasmids pFPCP2 and pFPCP8).