



УДК 577.217

СИНТЕЗ ПРОИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ  
*ESCHERICHIA COLI*Ефилов В. А., Алексюк И. В., Бурякова А. А., Пашкова И. Н.,  
Скиба Н. П., Чахмажчева О. Г.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

Изучена экспрессия синтетического гена проинсулина человека в клетках *E. coli* с использованием различных векторных систем, обеспечивающих как прямую экспрессию этого прогормона, так и его синтез в виде гибридных белков. Разработана схема выделения проинсулина из бактериальной массы. Показано, что при протеолитической обработке рекомбинантного проинсулина образуется инсулин человека.

Одним из важных для медицины белков, получение которого целесообразно проводить микробиологическим путем, является инсулин человека — гормон поджелудочной железы, регулирующий процессы углеводного обмена и поддержания нормального уровня сахара в крови. Существуют два возможных пути получения инсулина в бактериальной клетке: 1) полипептидные цепи, из которых состоит гормон (А- и В-цепи), могут быть независимо синтезированы в бактериях посредством экспрессии их генов, а затем соединены дисульфидными связями [1]; 2) микробиологический синтез предшественника инсулина — проинсулина и последующее энзиматическое превращение его в зрелый гормон [2]. Второй способ более перспективен, поскольку позволяет получать биологически активный инсулин с высоким выходом при меньших материальных затратах [3]. Кроме того, сам проинсулин человека и образующийся при его превращении в инсулин соединительный пептид (С-пептид) представляют значительный интерес с медицинской точки зрения.

В настоящей работе приводятся некоторые результаты, полученные при изучении экспрессии в клетках *E. coli* гена проинсулина человека, синтез и клонирование которого описаны нами ранее [4, 5], а также данные по выделению этого белка из бактериальной массы.

В ходе исследований были изучены различные системы экспрессии проинсулина в бактериальных клетках. На основе синтетического гена прогормона был сконструирован ряд рекомбинантных плазмид, предусматривающих как прямую экспрессию, так и получение прогормона в составе гибридных белков.

В первой серии плазмид в качестве регуляторных элементов транскрипции использовались различные промоторы, в частности синтетический промотор ДНК бактериофага fd [6, 7] и промотор триптофанового оперона. Так, в плазмиде рPL'RT<sub>trp</sub>, сконструированной на основе гена проинсулина человека LR [4, 5] аналогично тому, как это описано ранее для интерферона F [8], регуляция экспрессии осуществлялась за счет фрагмента ДНК, содержащего *trp*-промотор и участок ДНК, кодирующий мРНК с последовательностью, комплементарной 3'-концу 16S рибосомной РНК. Эта конструкция предусматривала регулируемый с помощью индуктора синтез проинсулина.

Другая плаزمида этой серии, рPLRfd1, была получена на основе гена проинсулина LR, в 5'-концевой части которого перед кодирующим прогормон районом содержался 15-звенный фрагмент, структура которого соответствовала участку Шайн — Дальгарно гена V бактериофага fd [4, 5]. Экспрессия гена LR обеспечивалась за счет промоторной области гена X ДНК бактериофага fd — искусственного фрагмента ДНК длиной

около 100 п. о., химический синтез которого был описан ранее [6, 7]. Клонированную промоторную область выделяли из плазмиды pPE9 обработкой эндонуклеазой рестрикции *EcoRI* и вводили по *EcoRI*-сайту вектора pPLR [4, 5] перед геном проинсулина человека. Из полученных после трансформации компетентных клеток *E. coli* колоний, устойчивых одновременно к ампициллину и тетрациклину, выделяли плазмидную ДНК и ее строение подтверждали рестриктивным анализом. Таким образом в составе плазмиды pPLRfd1 был получен функционально активный, полностью синтетический ген длиной около 400 п. о., содержащий промотор, последовательность Шайн — Дальгарно, структурный ген проинсулина человека, а также сигналы инициации и терминации трансляции (рис. 1). Эта конструкция была рассчитана на нерегулируемый (конститутивный) синтез проинсулина.

Другой возможностью получения проинсулина в бактериальных клетках является синтез в составе гибридных белков, в качестве N-концевых (лидерных) последовательностей которых чаще всего используются фрагменты некоторых бактериальных белков, таких, как  $\beta$ -галактозидаза *E. coli* [1, 8–10], продукт гена триптофанового оперона [11],  $\alpha$ -амилаза *Bacillus subtilis*, IgG-связывающий домен белка *A Staphylococcus aureus* [12].

На рис. 2 приведена общая схема получения проинсулина человека в виде гибридного белка с фрагментом  $\beta$ -галактозидазы (а) или с сигнальным пептидом  $\alpha$ -амилазы (б). В первом случае гибридный белок образует в цитоплазме нерастворимые агрегаты, во втором — экспрессирующийся химерный белок подвергается процессингу, причем образующийся при этом проинсулин может либо накапливаться в периплазматическом пространстве (в штаммах *E. coli*), либо выделяться в культуральную среду (в штаммах, подобных *B. subtilis*). Результаты, полученные при экспрессии синтетического гена проинсулина в виде гибрида с  $\alpha$ -амилазой, были опубликованы ранее [13].

Во второй серии описываемых в настоящей работе экспрессирующих плазмид условия транскрипции и трансляции гена проинсулина L'R [4, 5] были созданы за счет промотор-операторной области и части структурного гена  $\beta$ -галактозидазы *lac*-оперона *E. coli*, что предусматривает получение целевого белка в виде гибрида с фрагментом  $\beta$ -галактозидазы. С этой целью нами были использованы ранее сконструированные плазмидные векторы, обеспечивающие высокий уровень экспрессии коротких белков и пептидов [14].

Конструирование одной из плазмид этой серии, pGP25, проводилось введением между *EcoRI*- и *HindIII*-сайтами вектора pG1005 [14] гена проинсулина L'R (рис. 1б). Полученными рекомбинантными ДНК трансформировали клетки *E. coli* HB101. Селекция рекомбинантных клонов проводилась после посева на чашки Петри со средой, содержащей 5-бром-4-хлор-3-индолил- $\beta$ -D-галактопиранозид (X-gal). Отбирались колонии, устойчивые одновременно к ампициллину и тетрациклину и обладающие ярко-голубой окраской. В плазмиде pGP25 в качестве лидерной последовательности для гена проинсулина использовалась часть гена  $\beta$ -галактозидазы, кодирующая 1005 а. о. последней.

В другой плазмиде этой серии, pGPRV90, полученной введением гена проинсулина в вектор pG380 [14], с той же целью использовался ген, кодирующий укороченный до 380 а. о. N-концевой фрагмент  $\beta$ -галактозидазы. Аналогично, исходя из векторов pG280 и pG281 [14], были получены экспрессирующие плазмиды, которые кодировали синтез гибридного белка, включающего 280 а. о. N-концевой последовательности галактозидазы и проинсулин. Наличие таких укороченных предшествующих проинсулину лидеров должно было повышать выход целевого продукта в бактериальных клетках за счет уменьшения размеров части гибридного белка, не относящейся к искомому прогормону.

Уровень экспрессии химерного белка, обеспечиваемый описываемыми в данной работе плазмидами, определялся с помощью радиоиммунологического анализа. Для доказательства экспрессии проинсулина в составе

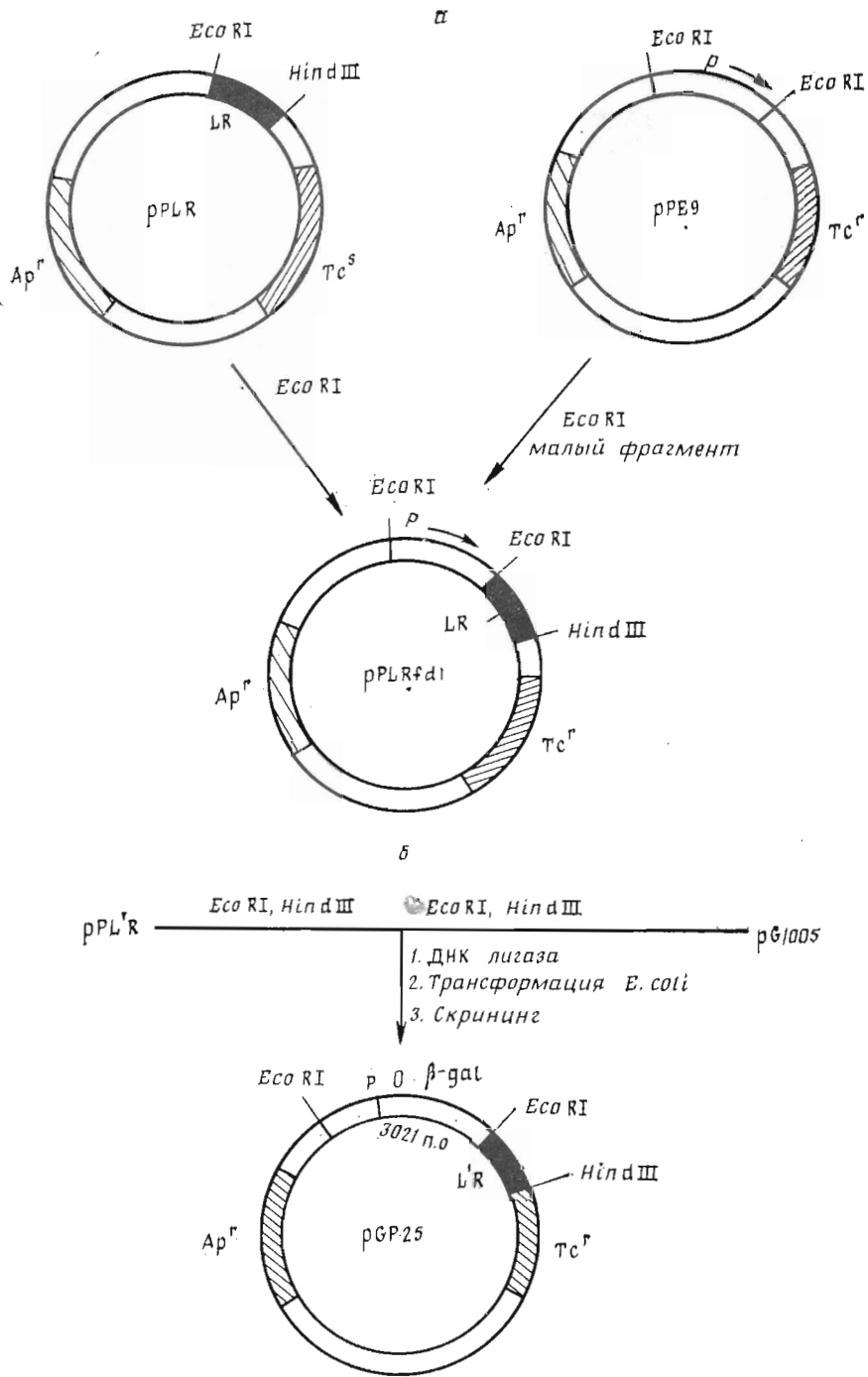


Рис. 1. Схемы получения плазмид pPLRfd<sub>1</sub> (а) и pGP25 (б), направляющих экспрессию гена проинсулина человека. Обозначены места действия эндонуклеаз рестрикции. P – промотор, O – оператор, β-gal – фрагмент гена β-галактозидазы *E. coli*. Зачернены гены проинсулина человека LR и L'R

гибридных белков с фрагментами β-галактозидазы проводилась также его идентификация в клеточных экстрактах *E. coli* с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (рис. 3) с последующим иммуноблоттингом. Так, уровень синтеза проинсулина в штаммах, полученных на основе *E. coli* HB 101 и плазмид, которые обеспечивали прямую экспрессию этого белка, составил ~1 мг/г биомассы, тогда как плазмиды на основе генов гибридных белков обеспечивали значительно более высокий уровень синтеза проинсулина (2–7 мг/г

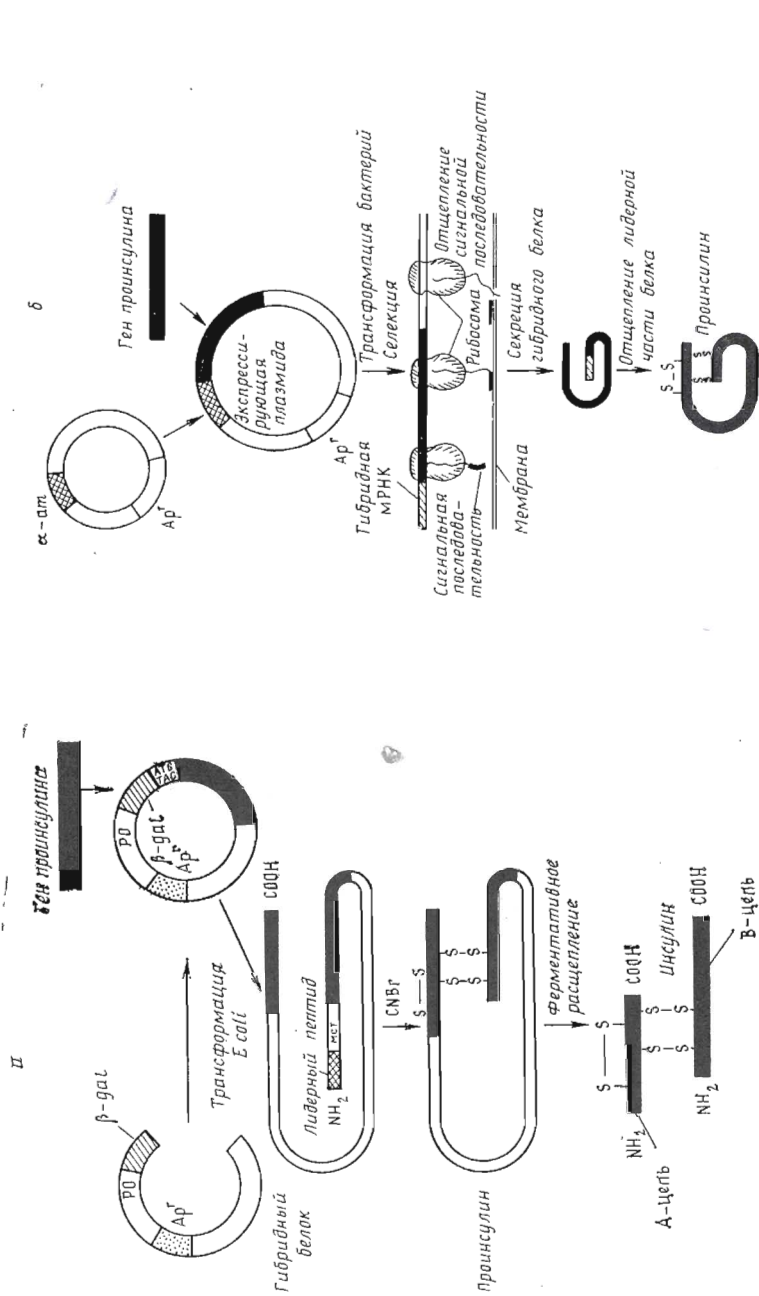


Рис. 2. Общая схема получения рекомбинантного проинсулина человека в виде гибридного белка с фрагментом  $\beta$ -галактозидазы *E. coli* (а) и с фрагментом  $\alpha$ -амилазы *E. subtilis* (б). Фрагменты генов  $\beta$ -галактозидазы ( $\beta$ -gal) и  $\alpha$ -амилазы ( $\alpha$ -am) заштрихованы

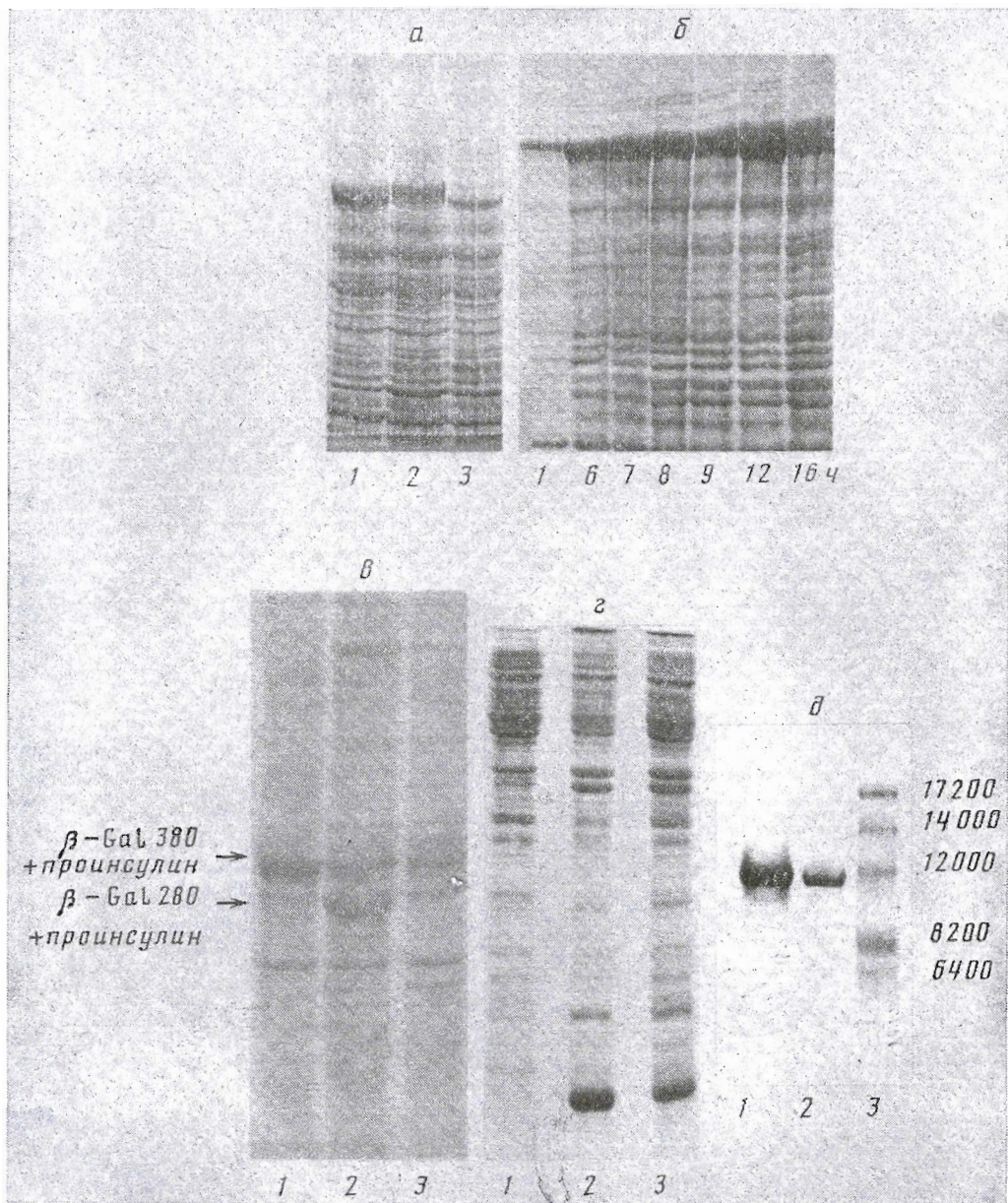


Рис. 3. Электрофорез клеточных экстрактов *E. coli* в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия: а – анализ белков штамма *E. coli* pGP25 в присутствии (1) и в отсутствие (2) IPTG и анализ белков *E. coli* HB101 (3); б – зависимость уровня биосинтеза химерного белка от фазы роста штамма-производителя *E. coli* pGP25; в – анализ белков штаммов *E. coli* VL902/pGPRV90 (1), VL902/pG280 (2) и *E. coli* VL902 (3), стрелками указано положение соответствующих химерных белков; г – анализ белков штамма *E. coli* VL902 (1), *E. coli* VL902/pPL'RT1 (2) и *E. coli* VL902/pPL'R39 (3); д – анализ гибридных белков, выделенных из штаммов *E. coli* VL902/pPL'RT1 (1) и pPL'R39 (2). (3) – молекулярные маркеры (цифры справа – мол. масса). Белковый электрофорез проводили в 7,5% (а–в) или 15% (г) геле, а пептидный форе́з (д) – в 15% геле

биомассы). Низкий уровень экспрессии в штаммах первой группы, по всей вероятности, был связан с чрезвычайной нестабильностью проинсулина в обычных бактериальных штаммах. По данным работы [15], период полураспада инсулина и проинсулина в клетках бактерий менее 2 мин. Это подтвердилось в ходе наших дальнейших экспериментов. Использование в качестве реципиентов для плазмид pPL'RTgr и pPL'Rfd1 некоторых мутантных штаммов *E. coli*, дефектных по ряду внутриклеточных протеиназ,

**Уровень синтеза проинсулина человека в различных штаммах-продуцентах по данным радиоиммунологического анализа на наличие С-пептида проинсулина**

Рекомбинантный штамм <i>E. coli</i>	Длина лидера в гибридном белке, а. о.	Выход проинсулина, мг/г клеток
HB101/pPL/RTp	—	<1
HB101/pPLRfd1	—	<1
VL902/pPLRfd1	—	3,0
HB101/pGP25	1007	2,0
HB101/pGPRV90	380	3,5
VL902/pGPRV90	380	6,5
HB101/pPL/RG250	280	3,5
VL902/pPL/RG250	280	7
VL902/pPL/R39	20	19
VL902/pPL/Rt1	20	25

*Примечание.* Культуры выращивали до стационарной фазы роста (в течение 10–12 ч), клетки отделяли центрифугированием и разрушали ультразвуком в присутствии PMSF. Аликвоты клеточной суспензии тестировали радиоиммунологическим методом на присутствие С-пептида проинсулина человека.

позволило повысить уровень синтеза проинсулина за счет уменьшения его протеиназной деградации. Однако такие мутантные штаммы оказались нестабильными, за исключением штамма, полученного на основе *lon*-мутанта VL902 и плазмиды pPLRfd1, обеспечивающего конститутивный (нерегулируемый) синтез проинсулина. Он обладал достаточной стабильностью в сочетании с уровнем экспрессии проинсулина, составляющим до 3 мг/г биомассы. Аналогично и векторы, кодирующие синтез гибридов проинсулина с укороченными фрагментами β-галактозидазы (280 и 380 а. о.), также давали в *lon*-мутанте более высокий уровень экспрессии, чем в HB101. Так, выход гибридного белка, кодируемого плазмидой pGPRV90, возрастал в мутанте VL902 до 6,5 мг/г биомассы по сравнению с 3,5 мг/г в HB101 (табл. 1).

Длина лидера гибридного белка оказывает существенное влияние на уровень его экспрессии, который значительно выше в штаммах *E. coli*/pGPRV90 и *E. coli*/pPL/R250, чем в *E. coli*/pGP25. Это объясняется прежде всего меньшими размерами гибридного белка. Очевидно, что при одинаковом абсолютном количестве гибрида, накапливаемом в клетке за время ферментации, относительное содержание проинсулина будет больше в том штамме, где меньше молекулярная масса гибридного белка. Кроме того, наличие короткого предшественника в гибридном белке значительно облегчает очистку проинсулина после его отщепления от лидера. Так, в случае предшественника длиной 1007 а. о. (плазмида pGP25) при расщеплении бромцианом гибридного белка образуется 24 пептида, в случае укороченной до 380 а. о. лидерной последовательности — 9, а в случае лидера длиной 280 а. о. — всего 4. Это меньше, чем удалось получить Ву, Нарангу и сотр. при экспрессии проинсулина в той же галактозидазной системе с использованием лидеров длиной 444 и 590 а. о. (12 и 16 бромциановых пептидов соответственно) [16]. Однако оптимальная длина предшественника зависит, по-видимому, от его первичной структуры и должна подбираться индивидуально для сочетания каждого экспрессируемого гена пептида и системы, в которой он экспрессируется. Как было показано ранее, при сильном сокращении размеров лидера в гибриде (например, до 8 а. о.) может исчезнуть основное свойство, придающее гибридным белкам существенное преимущество перед прямой экспрессией, — устойчивость гибридов к действию внутриклеточных протеиназ [16], что значительно снижает выход гибридного белка. Однако этот недостаток коротких гибридов может быть частично преодолен при использовании для их экспрессии штаммов, дефектных по внутриклеточным протеиназам. С другой стороны, изменяя первичную структуру короткого лидера, можно значительно снизить растворимость гибридного белка в цитоплазме клеток, а следовательно, увеличить его устойчивость к протеиназам. Это со-

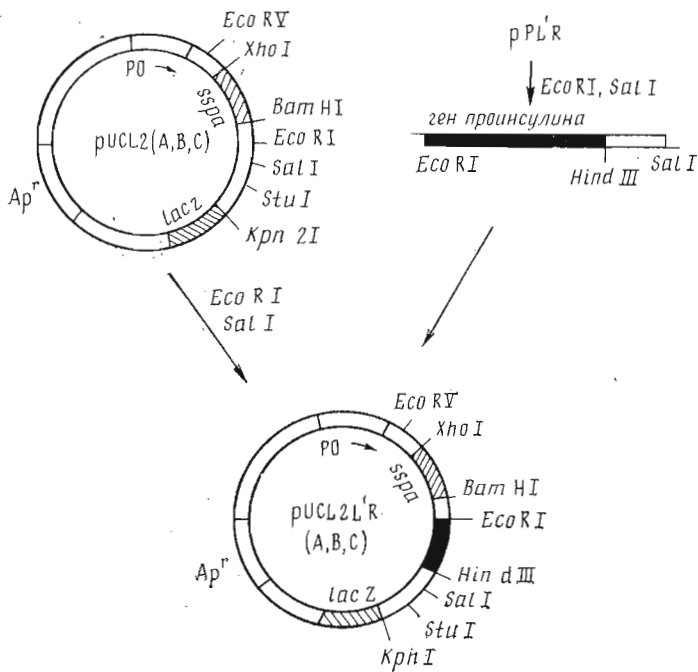


Рис. 4. Схема конструирования плазмид серии pUCL2L'R, обеспечивающих синтез проинсулина человека в клетках *E. coli* в составе гибридного белка с IgG-связывающим фрагментом белка А. Р – промотор, О – оператор, зачернен ген проинсулина L'R, lacZ – фрагмент lac-оперона, sspa – синтетический ген IgG-связывающего домена белка А

здает предпосылки для повышения технологичности бактериальных штаммов-продуцентов проинсулина в составе гибридных белков за счет дальнейшего уменьшения размеров лидерной последовательности.

Ранее было показано, что введение в короткие лидерные последовательности гибридных белков гомоаминокислотных кластеров в некоторых случаях резко изменяет свойства гибрида и значительно увеличивает его устойчивость к протеиназной деградации, а следовательно, и выход в клетках *E. coli* [17]. Так, введение поли-Thr-последовательности в гибридный белок проинсулина и галактозидазы позволило нам сократить длину лидера до 20–25 а.о. при сохранении нерастворимости самого гибридного белка в цитоплазме. При этом выход целевого белка в пересчете на проинсулин возрос до 20 мг/г биомассы (рис. 3, табл. 1).

Третья серия полученных нами плазмид кодировала синтез проинсулина в составе гибридных белков с IgG-связывающим фрагментом белка А *S. aureus* (SPA). Ранее нами был осуществлен химико-ферментативный синтез гена (*sspa*), который кодирует фрагмент белка А, состоящий из сигнального пептида и модифицированных Е и В доменов [18]. На основе гена *sspa* были получены векторы серии pUCL2, способные обеспечить экспрессию этого фрагмента белка А и его гибридов в *E. coli* (рис. 4). Введением гена проинсулина L'R в плазмиды pUCL2(A, B, C) между EcoRI- и SalI-сайтами были получены конструкции pUCL2AL'R, pUCL2BL'R и pUCL2CL'R, различающиеся структурой регуляторных участков ДНК, расположенных непосредственно перед геном *sspa*. Уровень экспрессии химерного проинсулина в штамме *E. coli* HB401, несущем эти плазмиды, определяли иммуноанализом по уровню экспрессии лидерного пептида [18] и оценивали как 7–10 мг/г биомассы. Причем в отличие от штаммов *E. coli*, несущих сами векторные молекулы pUCL2, в которых наблюдалась секреция фрагмента белка А в культуральную среду, в штаммах-продуцентах гибридного белка SPA-проинсулин такой секреции не наблюдалось, а весь гибридный белок накапливался в клетках.

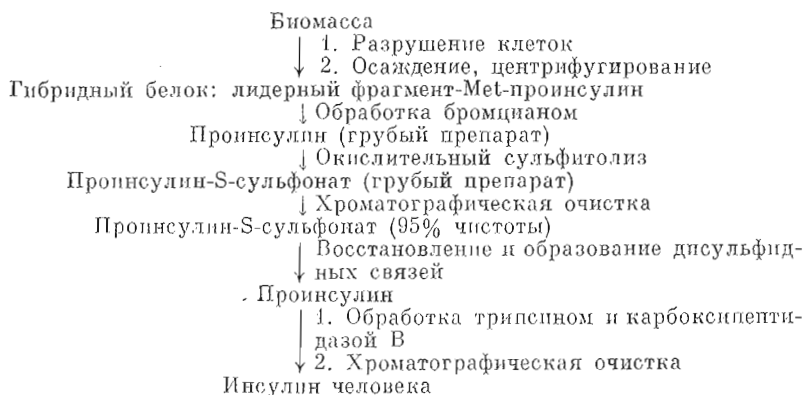
Таким образом, из вышеописанных штаммов-продуцентов проинсулина наиболее перспективны, по-видимому, продуценты коротких гибридных белков. Это связано с высоким уровнем синтеза в них проинсулина и со стабильностью таких гибридов в бактериальных клетках.

Одним из свойств ряда выше упомянутых химерных белков, образующихся при экспрессии кодирующих их генов в бактериях, является очень плохая растворимость в воде. Вследствие этого они образуют в цитоплазме клеток нерастворимые агрегаты («тела включения»), накапливающиеся на внутренней стенке мембраны и препятствующие протеиназной деградации белкового продукта.

В образующемся химерном белке проинсулиновый полипептид соединен с лидерной, N-концевой частью через остаток метионина и, поскольку сам проинсулин не содержит таких остатков, может быть легко отщеплен от остальной части гибридного белка обработкой бромцианом. При этом, чем короче длина лидера, тем выше выход проинсулина на 1 г гибридного белка и легче процесс его очистки.

Как показали проведенные нами эксперименты, во всех случаях количество химерного белка возрастало в бактериальной культуре по мере увеличения плотности клеток. Более того, оно увеличивалось и после прекращения их деления, что согласуется с данными работы [19]. Индукция изопропил-β-D-тиогаляктозидом (IPTG) в случае использования *lac*-системы приводила к повышению уровня экспрессии в 2–4 раза. При этом эффективность синтеза гибрида составляла 15–30% от суммарного количества клеточного белка по данным денситометрирования белковых зон при 575 нм после электрофореза в полиакриламидном геле и окрашивания кумасси (рис. 3).

Свойство гибрида плохо растворяться в воде и солевых растворах позволяет также упростить процедуру его выделения. Химерные белки выделяются из клеточных экстрактов с практически количественным выходом с применением простых процедур, включающих осаждение и центрифугирование (схема).



Следующая стадия выделения проинсулина — расщепление химерного белка бромцианом. Как и следовало ожидать, такая обработка не приводила к появлению в пептидной смеси активного прогормона, поскольку в процессе биосинтеза химерного белка в бактериальной клетке, по-видимому, вообще не происходит формирования дисульфидных связей в образующейся аминокислотной последовательности проинсулина [2] либо до какой-то степени происходит неспецифическое их образование. Отсутствие активности препарата на этой стадии подтверждается данными радиоиммунологического анализа (табл. 2).

Исходя из известной структуры лидера, например β-галактозидазы, при расщеплении химерных белков бромцианом можно ожидать образования нескольких фрагментов. Кроме того, все пептиды, за исключением C-концевого — проинсулина, существуют в растворе в двух формах, различающихся C-концевыми остатками: гомосерином и лактоном гомосерина. С целью подбора оптимальных условий их разделения была проведена



## Радиоиммунологическая активность препаратов проинсулина и инсулина человека на разных стадиях выделения

Препарат	Перекрестная реакция, % *	
	А	Б
Свиной инсулин	100	—
Свиной проинсулин	10	—
Проинсулин после бромцианового гидролиза гибридного белка	0,5	95
Проинсулин-S-сульфонат	0	95
Проинсулин (SH)	1,1	100
C-Пептид	0,05	100
Проинсулин	9,2	100
Инсулин	100	4

\* Способы анализа описаны в экспериментальной части. А — относительно свиного инсулина, Б — относительно С-пептида человека.

серия аналитических опытов. В случае большинства использованных нами лидеров попытки разделить смесь бромциановых пептидов гель-фильтрацией с использованием высоких концентраций наиболее эффективных хаотропных агентов (8 М мочевины, 6 М хлоргидрат гуанидина, 50% муравьиная кислота и др.) не дали удовлетворительных результатов. Даже в этих условиях большая часть пептидного материала находилась в агрегированном состоянии и элюировалась со свободным объемом колонки. Было установлено, что для первоначального фракционирования смеси бромциановых пептидов можно использовать кислотно-спиртовую экстракцию лиофильного препарата гидролизата химерного белка 70% этанолом, содержащим 2% соляную кислоту. По данным иммунологического анализа, проинсулин при этом практически количественно переходил в раствор.

Для предотвращения агрегации пептидов далее проводилось окисление остатков цистеина тетрационатом натрия в присутствии сульфита натрия с получением S-сульфонатных производных пептидов [20]. Этот же прием позволил в полной мере использовать не характерное для большинства других пептидов смеси свойство проинсулина — наличие большого количества остатков цистеина в его молекуле (шесть) для его дальнейшей очистки. После окисления фракционирование пептидов проводили анионообменной хроматографией, а затем гель-фильтрацией (рис. 5).

В случае же выделения проинсулина из химерных белков с коротким пептидным лидером (20–25 а.о.) процедура его очистки заметно упрощается, поскольку отщепляемые бромцианом пептиды значительно короче самого проинсулина и их количество минимально (1–3). При этом для отделения проинсулина вполне достаточно провести либо одну анионообменную хроматографию S-сульфонатного производного, либо только гель-фильтрацию (рис. 6).

Следует отметить, что радиоиммунологическое тестирование элюатов при хроматографии осуществлялось после предварительного восстановления дисульфидных связей обработкой избытком 2-меркаптоэтанола, так как S-сульфонатное производное проинсулина не обладает иммунологической активностью (табл. 2). Чистоту полученного препарата проинсулина подтверждали обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 7) и электрофорезом в 15% полиакриламидном геле. Проинсулин-S-сульфонат превращали в активный проинсулин обработкой 2-меркаптоэтанолом в условиях, благоприятствующих образованию правильных дисульфидных связей [20].

В результате из химерных белков был получен проинсулин человека 95–98% чистоты с выходом от 20 до 50% (в зависимости от структуры и длины химерного белка). Полученный биосинтетический проинсулин человека был идентичен природному по подвижности при электрофорезе в полиакриламидном геле, иммунологическим свойствам, а также по аминокислотному составу. Он был успешно превращен в инсулин человека пу-

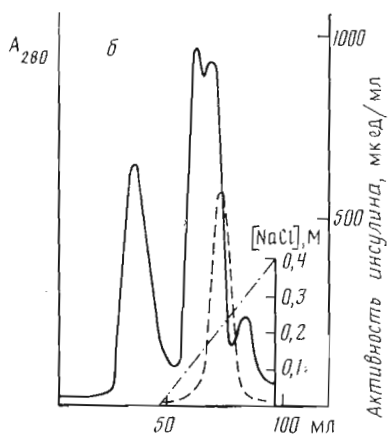
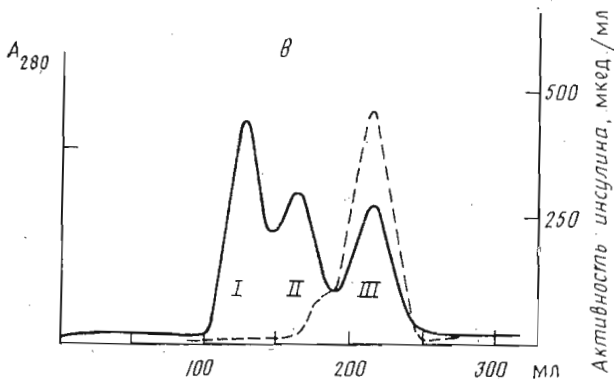
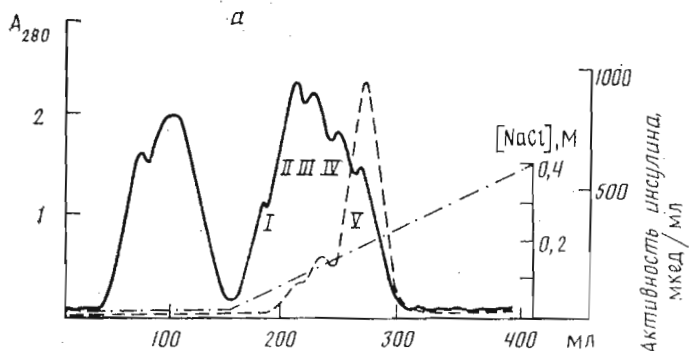


Рис. 5. Выделение проинсулина человека из смеси бромциановых пептидов гибридных белков, содержащих 1007 а. о. (а) и 280 а. о. (б)  $\beta$ -галактозидазы хроматографией на колонке с DEAE-сефацелом ( $2 \times 35$  см) в градиенте концентрации NaCl в 7,5 М мочеvine, содержащей 0,05 М трис-HCl (pH 7,5); в — гель-фильтрации пептидного материала из фракции V (а) на колонке с сефадексом G-75 ( $2,5 \times 60$  см) в 7,5 М мочеvine, содержащей 0,05 М трис-HCl (pH 7,5). Сплошной линией дана оптическая плотность при 280 нм, штриховой — инсулиновая активность, штрихпунктирной — концентрация NaCl

тем отщепления от прогормона 35-звенного С-пептида, соединяющего А- и В-цепи зрелого гормона, действием трипсина и карбоксипептидазы В [21]. Превращение проинсулина в инсулин контролировалось электрофорезом на бумаге, радиоиммунологическим анализом и обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 7), а его первичная структура подтверждалась секвенированием.

### Экспериментальная часть

В работе использованы ферменты нуклеинового обмена (Pharmacia, Швеция), трипсин и карбоксипептидаза В (Calbiochem, США), гуанидин-гидрохлорид, трис, бромциан и мочеvина (Merck, ФРГ), IPTG и 2-меркаптоэтанол (Serva, ФРГ).

Конструирование рекомбинантных ДНК, селекция клонов, выделение и анализ плазмидных ДНК проводили, как описано ранее [5, 18].

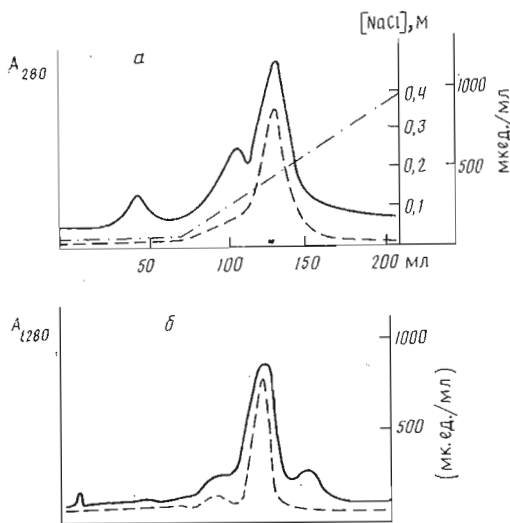


Рис. 6

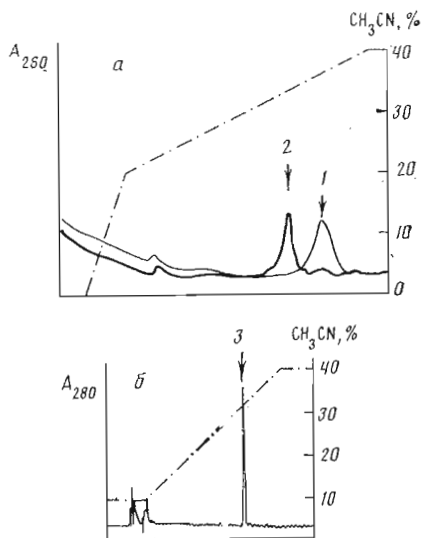


Рис. 7

Рис. 6. Выделение проинсулина человека из бромцианового гидролизата гибридного белка, содержащего лидер длиной 20 а. о.: *a* — хроматография на колонке с DEAE-Тоуореарл (1×10 см) в градиенте концентрации NaCl в 7,5 М мочевины, содержащей 0,05 М трис-HCl (pH 7,5); *б* — гель-фильтрация на колонке с TSK-Fractogel HW-55 (1×90 см) в 7,5 М мочевины, содержащей 0,05 М трис-HCl (pH 7,5). Сплошной линией дана оптическая плотность при 280 нм, штриховой — инсулиновая активность, штрихпунктирной — концентрация NaCl

Рис. 7. Обращенно-фазовая хроматография проинсулин-S-сульфоната (1), проинсулина (2) и инсулина (3) человека на колонке (4,6×25 см) с Ultrasphere C-18 в градиенте концентрации ацетонитрила в буфере, содержащем 0,2 М сульфат аммония и 50 мМ ацетат натрия (pH 4,0). Сплошная линия — оптическая плотность при 280 нм, штрихпунктирная — концентрация ацетонитрила. Стрелками показано положение пиков целевых соединений

Электрофорез белков проводили в пластинах 7 и 15% акриламидного геля, содержащего додецилсульфат натрия (SDS), по методу Лэмбли [22], а электрофорез пептидов — в 15% акриламидном геле по методу [23]. Клетки выращивали на богатой среде при сильной аэрации, выделяли центрифугированием и суспендировали в 0,06 М трис-HCl (pH 6,8), содержащем 2% додецилсульфата натрия, 10% глицерина и 5% меркаптоэтанол, после прогревания при 100°С в течение 2 мин алиquotы наносили на гель. Электроблоттинг белковых зон, полученных в результате электрофореза, проводили на аппарате фирмы Bio-Rad (США) с использованием нитроцеллюлозных листов BA-85 в течение 2 ч при напряжении 60 В при 10°С в буфере, содержащем 25 мМ трис, 192 мМ глицин (pH 8,3), 20% метанол и 0,02% SDS.

Имуноферментный анализ белковых зон на нитроцеллюлозных листах проводили как описано в работе [45] с антителами к инсулину или С-пептиду фирмы Novo (Дания) и использованием конъюгата пероксидазы с антителами против иммуноглобулинов кролика. В качестве субстрата применяли 3,3'-диаминобензидин.

Радиоиммунологическую активность препаратов проинсулина и инсулина определяли относительно свиного инсулина с помощью набора реактивов рино-ИНС-ПГ-<sup>125</sup>I (СССР), а относительно С-пептида — с помощью стандартных наборов на С-пептид фирмы INC (США).

Подтверждение аминокислотной последовательности инсулина проводили на приборе Protein Sequencer 477А фирмы Applied Biosystems (США).

Для выделения гибридных белков, состоящих из фрагмента β-галактозидазы и проинсулина, сырую биомассу суспендировали в буфере, содержащем 5% глицерин, 50 мМ ЕВТА, 0,1 М трис-HCl (pH 7,9), 0,1 мМ фенолметилсульфенилфторид, 0,2 М хлористый натрий и 1 мМ дитиотреит, и обрабатывали ультразвуком при 0°С. После центрифугирования при

10 000g (30 мин) супернатант отбрасывали, а осадок суспендировали в 6 М гуанидиний хлориде. Суспензию центрифугировали 30 мин при 15 000g, супернатант разбавляли в 6 раз холодной водой и выпавший осадок гибридного белка собирали центрифугированием при 5000g (15 мин).

Расщепление гибридного белка (1 г) бромцианом (1 г) проводили в 80% муравьиной кислоте (15 мл) при комнатной температуре 18–20 ч. Полученный раствор упаривали досуха, к остатку прибавляли воду и проводили лиофилизацию.

Полученную после обработки бромцианом смесь пептидов (2 г) суспендировали в 50 мл 6 М гуанидий хлорида, доводили pH раствора до 9,0 этаноламином, а затем прибавляли 2,5 г сульфата натрия и 1,25 г тетрагидрата натрия. Реакционную смесь перемешивали 6 ч при комнатной температуре и диализовали против 1 мМ EDTA.

Для превращения проинсулина в инсулин очищенный проинсулин-сульфонат (1 г) растворяли в 0,5 л буфера, содержащего 40 мМ глицин (pH 10,6), 3 М мочевины и 0,3 М хлористый натрий. Затем прибавляли 2-меркаптоэтанол до концентрации 0,4 мМ. Через 4 ч реакцию останавливали прибавлением уксусной кислоты. После диализа против 1 М уксусной кислоты и лиофилизации проинсулин растворяли в 0,1 М трис-HCl (pH 7,5) и инкубировали 30 мин со смесью трипсина (25 мкг/мл) и карбоксипептидазы В (12,5 мкг/мл) при 37° С. Реакцию останавливали прибавлением уксусной кислоты. Полученную при этом смесь пептидов подвергали обращенно-фазовой хроматографии. Фракции пика, содержащего инсулин, объединяли и лиофилизуют.

Авторы признательны В. Г. Дебабову и В. А. Лившицу за предоставление штамма *E. coli* VL902, Б. В. Радько за проведение иммунологического анализа и И. В. Назимову за секвенирование инсулина.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goeddel D. V., Kleid D. G., Bolivar F., Heyneker H. L., Yansura D. G., Grea R., Hirose T., Kraszewski A., Itakura K., Riggs A. D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. № 1. P. 106–110.
2. Chan S. G., Weiss J., Konrad M., White T., Bahl C., Yu S.-D., Marks D., Steiner D. F. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 9. P. 5401–5405.
3. Brousseau R., Scarpulla R., Sung W., Hsiung H. M., Narang S. A., Wu R. // Gene. 1982. V. 17. № 3. P. 279–289.
4. Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 270. № 3. С. 743–747.
5. Ovchinnikov Yu. A., Efimov V. A., Ivanova I. N., Reverdatto S. V., Skiba N. P., Chakhmakhcheva O. G. // Gene. 1984. V. 31. № 1. P. 65–78.
6. Ovchinnikov Yu. A., Efimov V. A., Chakhmakhcheva O. G. // FEBS Letters. 1979. V. 100. № 2. P. 341–346.
7. Овчинников Ю. А., Свердлов Е. Д., Царев С. А., Ходкова Е. М., Монастырская Г. С., Соломатина И. С., Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г., Соловьев В. Д., Кузнецов В. П., Жданов В. М., Новохацкий А. С., Аспестов Р. Д. // Докл. АН СССР. 1982. Т. 265. № 1. С. 238–242.
8. Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A. D., Heyneker H. L., Bolivar F., Boyer H. W. // Science. 1977. V. 198. № 4321. P. 1056–1063.
9. Shine J., Fettes I., Lau N. S., Roberts J. L., Baxter J. D. // Nature. 1980. V. 285. № 5765. P. 456–461.
10. Овчинников Ю. А., Долганов Г. М., Ефимов В. А., Монастырская Г. С., Свердлов Е. Д., Ходкова Е. М., Чахмахчева О. Г., Честухин А. В., Шемякин М. Ф. // Докл. АН СССР. 1979. Т. 248. № 6. С. 1486–1491.
11. Burnett J. P. Experimental Manipulation of Gene Expression. N. Y.: Acad. Press, 1983. P. 261–271.
12. Moks T., Abrahmsen L., Osterlof B., Josephson S., Ostling M., Enfors S.-O., Persson I., Nilsson B., Whlen M. // Biotechnology. 1987. V. 5. № 2. P. 379–382.
13. Демьянова И. Г., Бологин А. П., Новиков А. А., Сорокин А. В., Лебедев А. Н., Стронгин А. Я., Козлов Ю. И., Reverdatto S. B., Чахмахчева О. Г., Ефимов В. А., Дебабов В. Г. // Антибиотики и медицинская биотехнология. 1987. Т. 32. № 11. С. 820–824.
14. Чахмахчева О. Г., Мирских О. В., Чьонг Нам Хай, Ефимов В. А. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 3. С. 350–358.
15. Swanig K. H. S., Goldberg A. L. // J. Bacteriol. 1982. V. 149. № 3. P. 1027–1033.
16. Guo L.-H., Stepien P., Yun Tso J., Brousseau R., Narang S., Thomas D. Y., Wu R. // Gene. 1984. V. 29. № 1/2. P. 251–254.
17. Sung W. L., Yao F.-L., Zahab D., Narang S. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 3. P. 561–565.

18. Ефимов В. А., Бурякова А. А., Полушин Н. Н., Пашкова И. Н., Дмитракова Е. В., Чахмахчева О. Г. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 8. С. 1070-1077.
19. Williams D. C., Van Frank R. M., Muth W. L., Burnett J. P. // Science. 1982. V. 215. № 3. P. 687-689.
20. Wetzel R., Heinekar H. L., Yansura D. G., Hirose T., Kraszewski A., Riggs A. D., Itakura K., Goeddel D. V. // Gene. 1981. V. 16. № 1-3. P. 63-71.
21. Kemmler W., Peterson J. D., Steiner D. F. // J. Biol. Chem. 1971. V. 246. № 22. P. 6786-6791.
22. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680-685.
23. Swank R. T., Munkres K. D. // Anal. Biochem. 1971. V. 39. № 2. P. 462-477.

Поступила в редакцию  
13.II.1989

После доработки  
20.III.1989

## SYNTHESIS OF HUMAN PROINSULIN IN *ESCHERICHIA COLI* CELLS

EFIMOV V. A., ALEKSYUK I. V., BURYAKOVA A. A., PASHKOVA I. N.,  
SKIBA N. P., CHAKHMAKHCHEVA O. G.

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

Expression of the synthetic gene for human proinsulin in *E. coli* has been investigated. The proinsulin gene has been expressed directly under the control of a synthetic promoter of phage fd DNA and a promoter of tryptophan operon, or using fusions with fragments of some bacterial proteins. These fusions gave insoluble polypeptide products amounting to 20-30% of total cellular protein. The scheme for isolating proinsulin from bacterial cells was developed. Proinsulin was cleaved from leader polypeptides by treatment with cyanogen bromide and converted into human insulin.