



УДК 577(214.625 + 217.52) : 577.113.6

**ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ И КЛОНИРОВАНИЕ ДНК,
КОДИРУЮЩЕЙ СИГНАЛ ДЛЯ СЕКРЕЦИИ БЕЛКОВ
В ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЯХ****Добрынин В. Н., Калининченко С. В., Фархутдинов М. Р.,
Филиппов С. А., Горобко В. Г.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук
СССР, Москва*

Осуществлен химико-ферментативный синтез и клонирование в *E. coli* искусственного гена, кодирующего лидерный пептид и 22N-концевые аминокислоты зрелого белка карбоксипептидазы G2 *Pseudomonas* sp., слитые через сигнал для энтеропептидазы (Asp₄Lys) с аминокислотной последовательностью 4—157 зрелого фактора некроза опухоли человека. Показано, что при экспрессии этого гена в клетках *E. coli* происходит отщепление лидерного пептида; получающийся при этом гибридный белок локализован в мембранной фракции.

Достижения генетической инженерии сделали возможным экспрессию чужеродных генов в клетках *E. coli* [1]. Эта грамотрицательная бактерия имеет две клеточные мембраны — цитоплазматическую и наружную, которые служат барьером для проникновения макромолекул. Цитоплазматическая мембрана имеет механизм для транспорта через нее белков. Поэтому продукты экспрессии генов могут находиться в клетках *E. coli* либо в цитоплазме, либо в периплазматическом пространстве. Для того чтобы белок транспортировался в периплазму, необходимо, чтобы он синтезировался в виде предшественника, содержащего сигнальный пептид на N-конце [2].

Системы экспрессии генов с секрецией продуктов обладают значительными преимуществами перед обычными. Во-первых, в результате процессинга сигнальной последовательности получают белковые продукты, идентичные природным, тогда как при обычном подходе конструирования штаммов-продуцентов первичным продуктом биосинтеза являются формилметиониновые производные этих белков. Отщепление же N-концевого остатка формилметионина происходит не всегда [3, 4]. Во-вторых, протеиназная активность в периплазме значительно ниже, чем в цитоплазме, и, следовательно, продукты биосинтеза стабильнее в периплазме. В-третьих, некоторые белки могут быть высокотоксичны для бактериальной клетки, и поэтому для сохранения жизнеспособности клеток было бы желательно, чтобы эти белки транспортировались через цитоплазматическую мембрану в процессе биосинтеза. Наконец, в-четвертых, конструирование секреторирующих штаммов-продуцентов чрезвычайно перспективно для создания микробиологических процессов на основе иммобилизованных клеток. Так, в работе [5] было показано, что иммобилизованные в гранулах агарозы клетки *Bacillus subtilis*, содержавшие гибридную плазмиду, в которой регуляторная область с лидерным пептидом *B. licheniformis* состыкована со структурным геном проинсулина крысы, в течение нескольких суток секретировали в среду проинсулин. Необходимо также отметить, что секреция белка в периплазматическое пространство или в культуральную среду значительно облегчает его очистку.

В настоящем сообщении мы описываем химико-ферментативный синтез и клонирование в *E. coli* ДНК, кодирующей сигнальный пептид кар-

В работе использовали только дезоксирибоодинонуклеотиды, поэтому префикс «d» в формулах олигонуклеотидов для краткости опущен. TNF — фактор некроза опухоли человека.

SD *fMetArgProSerIleHisArgThrAlaIleAlaAlaValLeu-*
 GATCCTAAT[•]TAAATAAGGATATCATCGATGAGACCGTCTATCCATCGTACCGCTATCGGTGCTGTGCTG-
 GATTAATTTATTCCTATAGTAGCTACTCTGGCAGATAGGTAGCATGGCGATAGCGACGACACGAC-
 BamHI EcoRV ClaI

AlaThrAlaPheValAlaGlyThrAlaLeuAlaGlnLysArgAspAsnValLeuPheGlnAlaAlaThr-
 GCTACCGCTTTCGTGTGCTGGCACTGCTCTGGCTCAGAAAAGAGATAACGTTCTGTTCAGGCTGCAACC-
 CGATGGCGAAAAGCAACGACCGTGACGAGACCGAGTCTTTTCTCTATTCCAAGACAAGGTCCGACGCTGG-



AspGluGlnProAlaValAspAspAspAspLysValProTyrTyrTyrTer
 GACGAAACAGCCCGCTGTGCAO[•]GATGATGATAAGGTACCTTACTACTACTA
 CTGCTGTGCGGCCGACAGCTGCTACTACTGTTCATGGAATGATGATGATTCG_n
 SalI KpnI HindIII

a



...ValAspAspAspAspLysSerSerArgAsnPro... IleAlaLeuTER
 ...GTGACGATGATGATAAGTCGAGCCGAAACCCC... ATTGCCCTGTGA... AAGCTT...
 ...CAGCTGCTACTACTATTTCAGCTCGGCTTTGGGG... TAACGGGACACT... TTCGAA...
 SalI HindIII

b

Рис. 1. Нуклеотидная последовательность синтетической ДНК (a), часть нуклеотидной последовательности плазмиды рCP-TNF (b) и кодируемые ими последовательности аминокислот. Указаны сайты рестрикционных эндонуклеаз. Подчеркнуты последовательность Шайн-Дальгарно (SD), иницирующий и терминирующие кодоны. Стрелкой указано место действия энтеропептидазы из тонкого кишечника свиньи

боксипептидазы G2 из *Pseudomonas* sp. и попытку его использования для транспорта через цитоплазматическую мембрану кишечной палочки продуктов генной экспрессии. Карбоксипептидаза G2 — фермент, вырабатываемый грамотрицательными бактериями рода *Pseudomonas*. Ген карбоксипептидазы клонирован в *E.coli*, определена его нуклеотидная последовательность [6]. Предшественник карбоксипептидазы G2 содержит классический сигнальный пептид, состоящий из короткого (7 аминокислот) гидрофильного и протяженного (15 аминокислот) гидрофобного сегмента, который имеет значительную гомологию с последующими 15 аминокислотами, что послужило основанием для предположения о существовании двух tandemных сигнальных последовательностей. При экспрессии гена карбоксипептидазы в *E.coli* почти весь белок (97%) обнаруживался в периплазме, однако в работе [7] отсутствуют какие-либо данные о процессинге лидерного пептида. Сигнальная последовательность карбоксипептидазы G2 была использована для секреции β-галактозидазы *E.coli* [8]. Анализ продуктов экспрессии гибридного гена в клетках *E.coli* MC1061 показал, что более 50% β-галактозидазной активности обнаруживается в периплазме, около 19% — в мембранной фракции и 31% — в цитоплазме.

С учетом изложенного мы спланировали для химического синтеза 188-звенную двухцепочечную ДНК (рис. 1, a), фланкированную сайтами рестриктаз *Bam*HI и *Hind*III для клонирования. Начальная часть этой ДНК содержит синтетическую последовательность Шайн-Дальгарно (SD)

Номер	Структура олигонуклеотида	Число н. о.
I	GATCCTAATTTAAATAAGGATATCATCGATG	30
II	ACGGTCTCATCGATGATATCCTTATTTAATTAG	33
III	AGACCGTCTATCCATCGTFCGGCTATCGGTGC	32
IV	CAGCACAGCAGCTAGAGCTGGACGATGGATAG	32
V	TGTGCTGGCTACCGCTTTCGTTGCTGGCACTGCTCTGGCTCAGAAAAGAGATAA-CGTTCTGTTCC	65
VI	CCAGAGCAGTGGCAGCAACGAAAGCGGTAGC	32
VII	GCAGCCTGGAACAGAACGTATCTCTTTTCTGA	33
VIII	AGGCTGCAACCGACGAACAGCCGGCTGTGGA	31
IX	CGATGATGACAAGGTACCTTACTACTACTA	30
X	TCATCGTCGACAGCCGGCTGTTTCGTGCGGT	30
XI	AGCTTAGTAGTAGTAAGGTAGGTTGTCA	28

с предшествующими, терминирующими все фазы трансляции кодонами (нуклеотиды 6—27). Синтетический сайт инициации трансляции содержит уникальные сайты рестриктаз *EcoRV* и *ClaI*, позволяющие изменять как нуклеотидную последовательность самого сайта инициации трансляции, так и расстояние между иницирующим кодоном и последовательностью

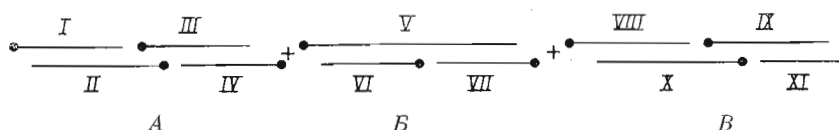


Рис. 2. Схема лигазных шивков синтетических олигонуклеотидов. Кругами обозначены 5'-концы олигонуклеотидов

SD. Участки 28—48 и 49—90 кодируют соответственно гидрофильный и гидрофобный фрагменты лидерного пептида (всего 22 аминокислоты) карбоксипептидазы G2. После участка 91—156, кодирующего 22 аминокислотных остатка зрелого белка, идет нуклеотидная последовательность, кодирующая сайт узнавания и специфического расщепления полипептидной цепи энтеропептидазой (энтерокиназой) тонкого кишечника свиньи [9] (нуклеотиды 157—181). Сайты рестрикционных эндонуклеаз *KpnI* и *HindIII* предназначены для точного слияния целевого гена с участком, кодирующим сигнал процессинга для энтерокиназы по способу, описанному в работе [10]. При планировании синтетического гена мы перекодировали часть аминокислот, во-первых, чтобы избежать очень высокого содержания остатков G и C, характерного для ДНК из *Pseudomonas sp.*, и, во-вторых, чтобы учесть частоту встречаемости кодонов в *E. coli*.

Для получения этой ДНК были синтезированы фосфитамидным методом [11] в автоматическом режиме 11 олигонуклеотидов (I)—(XI) величиной от 28 до 65 нуклеотидных звеньев (таблица). Лигазные шивки олигонуклеотидов проводили в два этапа (рис. 2): сначала сшивали олигонуклеотиды сегментов А, В и В, причем в случае сегментов А и В шивки проводили раздельно по цепям, как описано в работе [12], после чего продукты шивки очищали электрофорезом в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины. На втором этапе смешивали полученные таким образом олигонуклеотиды после 5-фосфорилирования (кроме олигонуклеотидов I и XI) и сшивали при помощи ДНК-лигазы T4. Получившуюся в результате 188-звенную двухцепочечную ДНК очищали электрофорезом в 15% ПААГ и ее структуру подтверждали определением нуклеотидной последовательности модифицированным методом Максама — Гилберта [13].

Для встраивания синтетической ДНК, кодирующей полную последовательность лидерного пептида, фрагмента зрелого белка карбоксипептидазы G2 и участка узнавания энтеропептидазы, мы сконструировали плазмидный вектор pDS256. Для этого сначала в плазмиде pLZ56 [14] уничтожили сайт *KpnI* путем удаления выступающих 3'-концов обработкой ли-

неаризованной при помощи *KpnI* плазмиды pLZ56 ДНК-полимеразой I *E. coli* (фрагмент Кленова). Тупоконечное лигирование привело к плазмиде pLZ56/*KpnI*, из которой промоторсодержащий фрагмент *PstI/BamHI* был перенесен в плазмиду pDS1₀⁺ [15]. В результате получили векторную плазмиду pDS256, которая содержит тандем двух промоторов ранней области бактериофага T7, обеспечивающий высокий уровень транскрипции, и необходимые для клонирования сайты рестрикционных эндонуклеаз. ДНК плазмиды pDS256 расщепляли совместно рестриктазами *BamI* и *HindIII* и большой фрагмент лигировали с избытком синтетической двухцепочечной ДНК, после чего лигазной смесью трансформировали competentные клетки *E. coli* HB101.

Скрининг целевых клонов проводили путем гибридизации колоний *in situ* с ³²P-мечеными олигонуклеотидами (I) и (XI). Из колоний, гибридизующихся с обоими радиоактивными пробами, выделили плазмидную ДНК pCPG2, строение которой подтверждали рестриктивным анализом с помощью эндонуклеаз *HaeIII* и *MspI*, а также определением нуклеотидной последовательности плазмидной ДНК в районе вставки синтетического фрагмента.

Полученная плазмиды pCPG2 содержит экспрессирующийся под контролем тандема сильных промоторов генетический эквивалент сигнального пептида и N-концевой части зрелой карбоксипептидазы, сочлененной с аминокислотной последовательностью, узнаваемой и расщепляемой энтеропептидазой кишечника свиньи. Как уже отмечалось выше, наличие сайта *KpnI* позволяет точно соединить на генетическом уровне сигнальную последовательность энтерокиназы с любой заранее заданной аминокислотной последовательностью. В качестве первой модели такого сочленения был выбран ген фактора некроза опухолей человека (TNF) — важного иммуномодулятора, обладающего избирательным цитотоксическим действием *in vitro* на ряд линий опухолевых клеток и вызывающего геморрагический некроз ряда солидных опухолей *in vivo* [16].

С этой целью мы использовали полученную ранее плазмиду pTNF2 [17], которая содержит полусинтетический ген, кодирующий зрелый белок ФНО. Для соединения генов плазмиду pCPG2 расщепили сначала рестриктазой *KpnI*, затем удалили выступающие 3'-концы обработкой ДНК гидролизом эндонуклеазой I *E. coli* (фрагмент Кленова), после чего образовавшуюся ДНК гидролизом эндонуклеазой *HindIII* и получившийся векторный фрагмент очищали электрофорезом в 0,8% геле легкоплавкой агарозы. С другой стороны, ДНК плазмиды pTNF2 гидролизом эндонуклеазой рестриктазой *XhoI* и после достройки «лишних» концов при помощи ДНК-полимеразы подвергали гидролизу рестриктазой *HindIII*. Малый фрагмент (величиной около 600 п. о.), содержащий ген TNF, после очистки электрофорезом в 1% геле легкоплавкой агарозы лигировали с векторным фрагментом, полученным из плазмиды pCPG2. После трансформации клеток *E. coli* проводили скрининг колоний, содержащих рекомбинантную ДНК, по устойчивости к ампициллину и хлорамфениколу и по гибридизации с мечеными фрагментами генов карбоксипептидазы G2 и TNF (олигонуклеотид (X) этой работы и СТАТСССAGGTCCTCT [17] соответственно). Из гибридизующихся с обоими зондами клонов выделяли плазмиду pCP-TNF, строение которой подтверждали рестриктивным анализом при помощи эндонуклеаз *HaeIII* и *MspI*, а также анализом нуклеотидной последовательности мест сочленения фрагментов.

Полученная таким образом плазмиды pCP-TNF кодирует биосинтез гибридного белка, в котором лидерная последовательность и N-концевая последовательность карбоксипептидазы G2 соединена через сайт специфического расщепления энтеропептидазой с полипептидом 4-157 зрелого TNF ФНО человека [18].

Мы провели первичный анализ продуктов экспрессии полученного искусственного гена. Для этого плазмидой pCP-TNF трансформировали competentные клетки *E. coli* SG20050 и проверили цитотоксическую активность осветленных лизатов с помощью цитопатического теста на клетках трансформированных фибробластов мыши L-929 [19]. Оказалось, что лизаты

клеток *E. coli* SG20050 с плазмидой рСР-TNF в отличие от лизатов с плазмидой рСРG2, имели относительно невысокий уровень цитотоксической активности (ср. [20]). Анализ суммарного белка SDS-электрофорезом в ПААГ по Лэммли [21] не позволил однозначно идентифицировать целевой белок. Чтобы охарактеризовать продукт экспрессии гибридного гена, мы применили чувствительный метод иммуноблоттинга. Для этого мы,

используя очищенный фактор некроза опухолей [21], получили поликлональные антитела с титром 1 : 2000 путем длительной иммунизации кроликов по схеме [22], обычно применяемой для слабых иммуногенов.

На рис. 3 показан анализ методом иммуноблоттинга суммарного клеточного белка штамма *E. coli* SG20050, содержащего плазмиду рСР-TNF, и частично очищенного препарата TNF (дорожки 4 и 7). В качестве отрицательного контроля использовали клетки *E. coli* SG20050 без плазмиды. Хорошо видно, что антитела специфически реагируют с TNF. В случае лизатов клеток с плазмидой рСР-TNF в Вестерн-блоте проявляется полоса белка с молекулярной массой ~20 кДа. Появление этой полосы свидетельствует об отщеплении в *E. coli* лидерного пептида (молекулярная масса предшественника, содержащего лидерный пептид, ~22 кДа). Дальнейший анализ (рис. 3, б) показал, что гибридный белок, состоящий из N-концевой последовательности карбоксипептидазы G2, сигнального участка энтеропептидазы и фактора некроза опухолей, локализован в мембранной фракции.

Таким образом, осуществлен частичный химико-ферментативный синтез и клонирование в *E. coli* гибридного гена, кодирующего ли-

дерный пептид и N-концевую часть зрелой карбоксипептидазы G2, слитые через энтеропептидазный линкер с фактором некроза опухолей человека. Показано, что при экспрессии этого гена происходит посттрансляционный процессинг лидерного пептида, причем получающийся белковый продукт локализован в мембранной фракции бактериальных клеток.

Авторы благодарят В. М. Афанасьева (Институт иммунологии Минмедмикробиопрома СССР, Любучаны, Московская обл.) и Н. П. Беркову за помощь в экспериментах по иммуноблоттингу.

Экспериментальная часть

Общие сведения об эксперименте см. в работе [11]. В работе использовали dNTP фирмы P-L Biochemicals [γ - 32 P]rATP, [α - 32 P]dATP и [α - 32 P]dGTP (> 3000 Ки/ммоль; Amersham, Англия); рестрикционные эндонуклеазы *Eco*R1, *Bam*HI, *Msp*I (НПО «Фермент», Вильнюс); остальные ферменты выделяли как описано в работах [23—25].

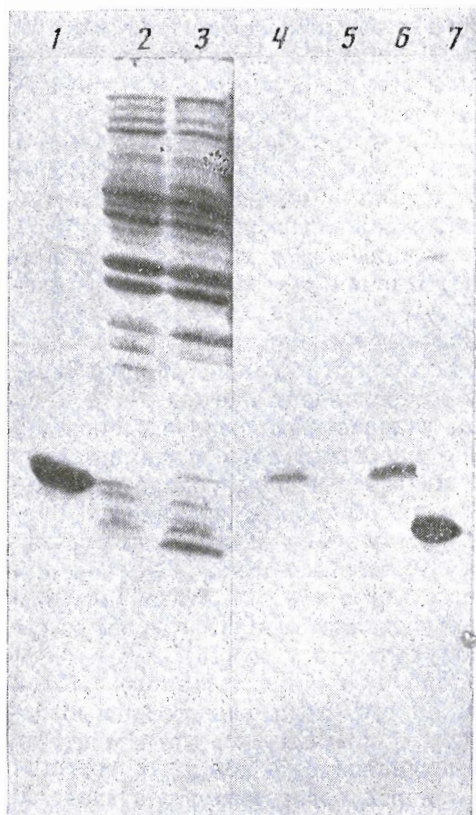


Рис. 3. Электрофорез частично очищенного препарата TNF (1, 7), суммарного белка клеток *E. coli* SG 20050 без плазмиды (2, 5), с плазмидой рСР-TNF (3, 4) и мембранной фракции клеток *E. coli* SG 20050 с плазмидой рСР-TNF (6). Проявление Кумасси (1—3) и иммуноблоттинг (4—7)

Синтез олигонуклеотидов (I)–(XI) выполняли твердофазным фосфитамидным методом на автоматическом синтезаторе ДНК System 1 (Beckman, США). Выделение олигонуклеотидов осуществляли с помощью электрофореза в 15% ПААГ, содержащем 7 М мочевины.

Лигазные шивки, клонирование и анализ клонов гибридизацией с олигонуклеотидными зондами проводили как описано в работе [12]. Анализ первичной структуры синтетических и рекомбинантных ДНК проводили твердофазным методом частичных химических модификаций [13].

Выделение поликлональных антител против TNF человека проводили следующим образом: сначала осаждали белки сыворотки иммунизированных кроликов сульфатом аммония (40% от насыщения). Осадок отделяли центрифугированием, затем растворяли в минимальном объеме воды и дважды диализовали в течение 12 ч при 4° С против дистиллированной воды и дважды по 24 ч при 4° С против 0,05 М натрий-ацетатного буфера, рН 5,0. Выпавший при этом осадок отделили центрифугированием; а надосадочную жидкость нанесли на колонку с DEAE-сефадексом А-50. Иммуноглобулины элюировали с колонки 1 М натрий-ацетатным буфером, рН 5,0. Титр полученных антител определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) [26].

Для анализа продуктов экспрессии гибридных генов клетки *E. coli*, содержащие плазмиду рСР-TNF, выращивали в течение 24 ч, при 37° С в 20 мл LB-бульона, содержащего хлорамфеникол (25 мкг/мл) и ампициллин (100 мкг/мл) на качалке при скорости вращения 150 об/мин. Отбирали пробу 1 мл, центрифугировали 5 мин при 6000 об/мин (центрифуга Beckman J2-21), осадок суспендировали в 60 мкл буфера для нанесения [19], нагревали 10 мин при 100° С и аликвоты наносили на 13,5% SDS-ПААГ для электрофореза. Основную часть центрифугировали, суспендировали в буфере, содержащем 50 мМ трис (рН 7,5), 0,5 М NaCl, 10 мМ меркаптоэтанол и 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторид, и озвучивали ультразвуком (22000 Гц) 10 раз по 30 с при 4° С. Осадок и надосадочную жидкость после центрифугирования (10 мин при 18 000 об/мин, Beckman J2-21) анализировали методом иммуноблоттинга после разделения белков электрофорезом в 13,5% SDS-ПААГ.

Иммуноблоттинг проводили как описано в работе [21].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Walter P., Blobel G. // *Nature*. 1982. V. 299. № 5885. P. 691–698.
3. Ben-Bassat A., Bauer K. // *Nature*. 1987. V. 326. № 6110. P. 315–316.
4. Palva I., Lechtovaara P., Kaariainen L., Sibakov V., Cantell K., Schein C. H., Kashiwagi K., Weismann C. // *Gene*. 1983. V. 22. № 2/3. P. 229–235.
5. Mosbach K., Birnbaum S., Hardy K., Davies J., Buelow R. // *Nature*. 1983. V. 302. № 5908. P. 543–545.
6. Minton N. P., Atkinson T., Bruton C. J., Sherwood R. F. // *Gene*. 1984. V. 31. № 1. P. 31–38.
7. Sherwood R., Minton N., Quirk A., Atkinson T. // *World Biotech. Report*. 1985. V. 1. P. 161–169.
8. Minton N. P., Marsh J., Bullman H. // *DNA*. 1984. V. 3. № 1. P. 99.
9. Belgage R. M., Mayne N. G., Van Frank R. M., Rutter W. E. // *DNA*. 1984. V. 3. № 1. P. 120.
10. Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф., Филиппов С. А., Чуепило С. А., Коробко В. Г., Воротицына Т. И., Бессмертная Л. Я., Михайлова А. Г., Америк А. Ю., Антонов В. К. // *Биоорганическая химия*. 1987. Т. 136. № 1. С. 119–121.
11. Atkinson T., Smith M. // *Oligonucleotide synthesis, a practical approach* / Ed. Gait. M. J. Oxford: IRL Press. 1984. P. 35–81.
12. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Болдырева Е. Ф., Шингарова Л. Н., Чуепило С. А., Филиппова Л. Ю., Звонок Н. М., Васильева Т. Е., Колосов М. Н. // *Биоорганическая химия*. 1987. Т. 13. № 1. С. 69–81.
13. Чуепило С. А., Кравченко В. В. // *Биоорганическая химия*. 1984. Т. 9. № 12. С. 1634–1637.
14. Подладчикова О. Н. Изучение зависимости между структурой и функцией прокаринотических промоторов. Дис. ... канд. хим. наук. М., 1985.
15. Stueber D., Bujard H. // *EMBO J.* 1982. V. 1. № 11. P. 1399–1404.
16. Fiers W., Broukaert P., Devos R., Fransen L., Leroux-Roels G., Remaut E., Sufys P., Tavernier J., Van der Heyden J., Van Roy F. // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1986. V. LI. P. 587–595.

17. Nedospasov S. A., Shakhov A. N., Turetskaya R. L., Mett V. A., Azizov M. M., Georgiev G. P., Korobko V. G., Dobrynin V. N., Filippov S. A., Bystrov N. S., Boldyreva E. F., Chuvpilo S. A., Chumakov A. M., Shingarova L. N., Ovchinnikov Yu. A. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1986. V. LI. P. 611—624.
18. Aggarwal B. B., Kohr W. R., Bass P. E., Moffat B., Spencer S. A., Henzel W. J., Bringman T. S., Nedwin G. E., Goeddel D. V., Harkins R. N. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 4. P. 2345—2354.
19. Liang C.-M., Liang S.-M., Jost T., Sand A., Douglas I., Allet B. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1986. V. 137. № 2. P. 847—854.
20. Добрынин В. Н., Беркова Н. П., Болдырева Е. Ф., Быстров Н. С., Кравченко В. В., Филиппов С. А., Чувило С. А., Шамборант О. Г., Коробко В. Г. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1530—1537.
21. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
22. Gurvich A. E., Karukava A. // J. Immunol. Methods. 1986. V. 87. № 1. P. 161—167.
23. Green P. J., Heyneker H. L., Bolivar F., Rodrigues R. L., Bettlach M. C., Covarrubias A. A., Backman K., Russel D. J., Tait R., Boyer H. W. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 7. P. 2373—2380.
24. Dolganov G. M., Chestukhin A. V., Shemyakin M. F. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 114. № 2. P. 247—254.
25. Klenow H., Henningsen R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1970. V. 65. № 1. P. 168—175.
26. Clark R., Engvall E. // Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Theoretical and practical aspects. Enzyme-Immunoassay / Ed. Maggio E. T. Florida: Boca Raton. 1981. P. 167—179.

Поступила в редакцию
10.XI.1988
После доработки
14.IV.1989

CHEMICAL-ENZYMATIC SYNTHESIS AND CLONING IN *ESCHERICHIA COLI* OF DNA ENCODING SIGNAL PEPTIDE SEQUENCE FOR PROTEIN SECRETION IN GRAM-NEGATIVE BACTERIA

DOBRYNIN V. N., KALINICHENKO S. V., FARKHUTDINOV M. R.,
FILIPPOV S. A., KOROBKO V. G.

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

Chemical-enzymatic synthesis of an artificial gene encoding leader peptide and 22 N-terminal amino acids of mature carboxypeptidase G2 from *Pseudomonas sp.* followed by enterokinase signal sequence (Asp₄Lys) has been accomplished. The resulted DNA was fused with semi-synthetic gene coding for polypeptide 4—157 of mature human tumour necrosis factor (TNF) and then placed under control of early promoters of T7 bacteriophage. The expression products of the construct obtained was analysed using anti-TNF anti-serum. In *E. coli* leader peptide was cleaved off during translocation through inner membrane and the resultant product was found in membrane fraction.