



УДК 577.112.088.3

© 1991 г.

С. В. Луценко, А. И. Гуревич, В. Ю. Каневский,  
В. А. Смирнов, И. В. Назимов\*, Т. Л. Ажикина\*,  
И. П. Чернов\*, В. М. Ростаншов\*, Н. В. Сонина,  
А. В. Ажаев

## ВЫДЕЛЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-3, ПРОДУЦИРУЕМОГО *E. COLI*

Совместное малое предприятие «Химтек», Москва;

\* Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Синтетический ген человеческого интерлейкина-3 (hIL3) клонирован в плазмиде рТЕ2IL3. При экспрессии гена в *E. coli* под контролем промотора  $P_{VII}$  фага fd и усилителя трансляции гена 10 фага T7 в условиях конститутивного биосинтеза накопление рекомбинантного hIL3 (в тельцах включения) достигало 30–40% тотального белка клетки. Предложен эффективный метод выделения hIL3. hIL3 был солибилизован в 5 М GнHCl, ренатурирован и очищен до гомогенности с использованием одной хроматографической стадии. Выход белка составлял 34 мг на 1 г влажных клеток. Полученный hIL3 обладает специфической биологической активностью.

Человеческий интерлейкин-3 (hIL3) — гликопротеин, продуцируемый Т-лимфоцитами при стимуляции клеток антигеном или митогеном. hIL3 является медиатором роста и дифференциации клеток различных линий, играет важную роль в регуляции гемопоэза и иммунного ответа [1, 2]. Интенсивное изучение физиологических функций и возможности использования в медицине hIL3 требует поиска источников его получения. В связи с труднодоступностью природного hIL3 представляется актуальной задача разработки методов экспрессии, получения и характеристики биологически активного рекомбинантного белка.

Недавно мы сообщили о высоком уровне экспрессии в *E. coli* искусственного гена hIL3, клонированного в плазмиде рТЕ2IL3, в которой транскрипция гена осуществлялась под контролем промотора ( $P_{VII}$ ) и терминатора фага fd и с помощью усилителя трансляции гена 10 фага T7 [3]. Для получения рекомбинантного hIL3 мы использовали культуру продуцента *E. coli* HB401 с плазмидой рТЕ2IL3 в условиях конститутивного биосинтеза. При этом накопление рекомбинантного hIL3 (в тельцах включения) достигало 30–40% тотального белка клетки. Продолжительность культивирования (20 ч при 37°С) была выбрана в соответствии с наивысшим содержанием hIL3 в тотальном лизате (рис. 1, 1) при достаточно высокой плотности клеток в культуре ( $A_{260}$  4–5). В этих условиях hIL3 накапливался в бактериальных клетках в виде нерастворимых белковых комплексов (телец включения). Задачей первого этапа выделения hIL3 было получение препарата телец включения с минимальным содержанием примесей.

В ряде работ по выделению интерлейкинов получение телец включения сводилось лишь к разрушению клеток и отделению супернатанта центрифугированием [4–6]. Полученные таким образом тельца включения сильно загрязнены примесями, что значительно затрудняет дальнейшую очистку целевого белка. В нашей работе для очистки телец включения были использованы последовательные отмывки препарата растворами тритона X-100 и мочевины, эффективно солибилизирующими примеси.

Сокращения: GнHCl — хлоргидрат гуанидина, TFA — трифторуксусная кислота, оф — обращенно-фазовая, РТН — фенилтиогидантоин.

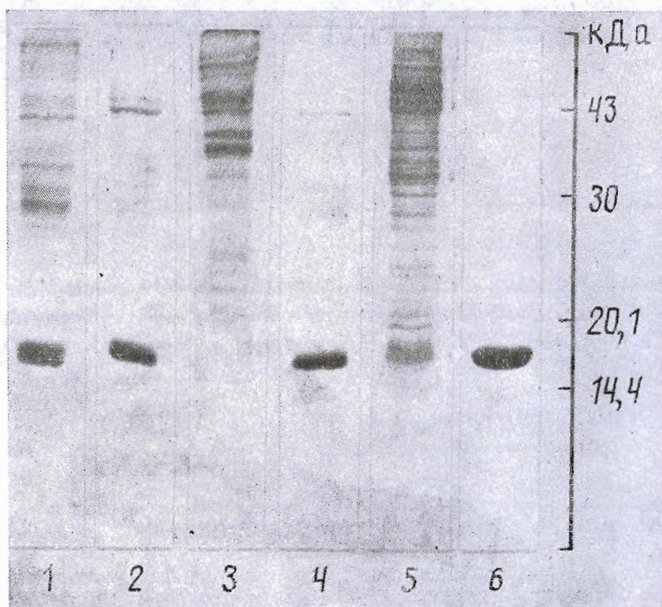


Рис. 1. Электрофорез в ПААГ препаратов hIL3 на различных стадиях очистки: 1 – клеточный лизат, 2 – супернатант экстракта GdnHCl, 3 – осадок после экстракции GdnHCl, 4 – супернатант препарата после диализа, 5 – осадок из препарата после диализа, 6 – элюат с CM-Toyopearl 650S

Для получения грубого препарата тельца включения клетки продуцента центрифугировали, промывали, суспендировали в буфере А\* и разрушали ультразвуком. Осадок, содержащий тельца включения, отделяли центрифугированием и дважды промывали раствором тритона X-100 в буфере Б. Данная обработка позволила удалить большую часть балластных белков из препарата тельца включения. Поскольку значительная часть примесей не солибилизовалась тритоном X-100, для дополнительной очистки тельца включения отмывали еще четыре раза раствором мочевины в буфере В. В результате использования принятой нами процедуры отмывки были получены высокоочищенные тельца включения hIL3 (рис. 1, 2) с минимальными потерями целевого белка. Представленная методика выделения hIL3 проста и позволяет уменьшить его потери в процессе ренатурации.

Ранее было показано, что в тельцах включения рекомбинантные белки, как правило, присутствуют в денатурированном состоянии [7]. Для получения биологически активной формы hIL3 требуется подбор условий эффективного растворения белка из тельца включения и последующей его ренатурации. Существуют данные о высокой солибилизирующей способности растворов мочевины и  $MgCl_2$  в отношении тельца включения рекомбинантных белков [5, 8]. Применение данных агентов для растворения тельца включения hIL3 оказалось неэффективным. В нашей работе для солибилизации был использован раствор 5 М GdnHCl, что позволило добиться практически полного растворения hIL3. После центрифугирования препарата незначительный осадок содержал лишь примесные белки (рис. 1, 3).

Ренатурацию hIL3 проводили при постепенном удалении денатурирующего агента в расчете на автоокисление SH-групп белка с образованием дисульфидных связей. Препарат hIL3 разбавляли фосфатным буферным раствором Г при интенсивном перемешивании до конечной концентрации GdnHCl 0,5 М, диализовали в течение 12 ч против этого же буфера и отделяли осажденные белки центрифугированием. В ходе диализа осаждались преимущественно балластные белки (рис. 1, 5). Частичное осаж-

\* Состав буферов см. в «Экспериментальной части».

## Очистка и ренатурация hIL3

Препарат	Количество	Суммарный белок, мг	hIL3, мг	Чистота, %	Очистка (число раз)	Выход, %
Влажные клетки *	1 г	174	52	30	1	100
Экстракт 5 М GnHCl	20 мл	100	50	50	1,7	96
Диализ (ренатурация)	220 мл	50	36	72	2,4	72
CM-Toyorearl	20 мл	34	34	98	3,3	65

\* Для определения содержания суммарного белка и hIL3 во влажных клетках *E. coli* 1 г биомассы лизировали в 8 М GnHCl.

дение hIL3, по-видимому, обусловлено образованием межмолекулярных дисульфидных связей и агрегацией интерлейкина с примесными белками. Значительная очистка hIL3 на стадии диализа достигалась за счет осаждения балластных белков (таблица). В ходе диализа процесс ренатурации hIL3 контролировали с использованием хроматографических критериев в данных об уровне биологической активности белка. Хроматографический контроль осуществляли, основываясь на различии во времени удерживания денатурированного hIL3 на обращенной фазе (рис. 2a). Как видно на рис. 2, после завершения диализа практически весь белок переходит в ренатурированную форму. С помощью реагента Элмана свободные SH-группы в полученном препарате не обнаруживались.

hIL3 из экстракта телец включения не проявлял биологической активности, тогда как после диализа его удельная активность составляла  $10^5$  ед./мг. Представленные данные указывают на то, что в процессе уменьшения концентрации хаотропного агента в препарате денатурированного hIL3 происходит автоокисление SH-групп с образованием дисульфидных связей и формированием нативной конформации белка.

Заключительную стадию очистки hIL3 проводили с использованием повообменной хроматографии на колонке с CM-Toyorearl. hIL3 элюировался с колонки при концентрации NaCl от 0,25 до 0,3 М (рис. 3). Чистоту препарата оценивали с помощью SDS-электрофореза (рис. 1, б) и офВЭЖХ. Чистота hIL3 по данным интегрирования хроматографических пиков составляла >98%.

Полученный препарат хранили 2 нед в буферном растворе Г при 4° С и несколько месяцев при -20 и -70° С. При указанных условиях хранения изменений биологической активности hIL3 не наблюдалось. 15-кратное замораживание-оттаивание препарата также не приводило к снижению биологической активности hIL3.

Результаты очистки hIL3 приведены в таблице. Представленный метод выделения позволил получить hIL3 в близком к гомогенному состоянии с выходом 65%. По данным SDS-электрофореза, молекулярная масса hIL3 составляет 16 кДа (вычисленное значение 15,2 кДа). Результаты пяти циклов N-концевого секвенирования hIL3 согласуются с известной аминокислотной последовательностью hIL3 [9]. Биологическая активность полученного hIL3 оценивалась по его способности стимулировать IL2-зависимую пролиферацию активированных Т-клеток (рис. 4). Она составила  $5 \cdot 10^6$  ед./мг белка.

Предложенный нами метод выделения позволяет получить в значительном количестве практически гомогенный, биологически активный hIL3 в течение короткого времени с использованием лишь одной хроматографической стадии.

### Экспериментальная часть

Использовали трис, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, дитиотреит, персульфат аммония, SDS, EDTA, GnHCl, мочевины, кумасси R-250, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma, США), 2-меркаптоэтанол (Fluka, Швейцария), набор белков-стандартов для электрофореза и гель-фильтрации (Pharmacia, Швеция), ацетонитрил, TFA (Merck, ФРГ), CM-Toyo-

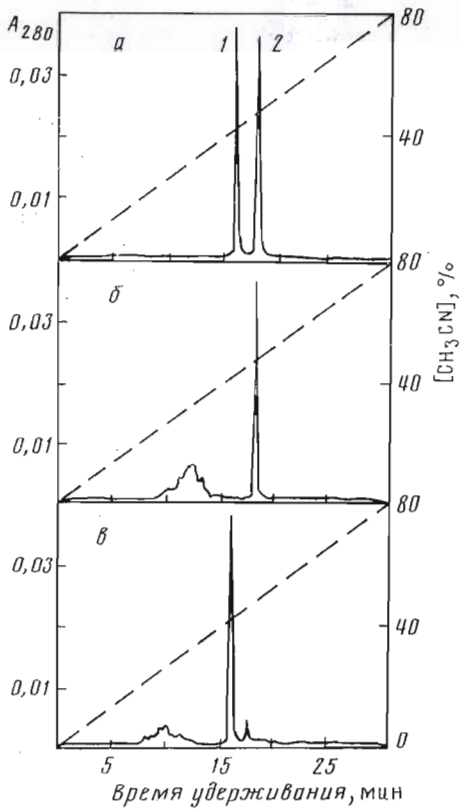


Рис. 2

Рис. 2. Разделение hIL3 на колонке с Nucleosil 300-5C<sub>4</sub>: а — смесь препаратов ренатурированного (1) и денатурированного (2) hIL3, б — Gp-HCl-экстракт теляц включения, в — препарат после диализа

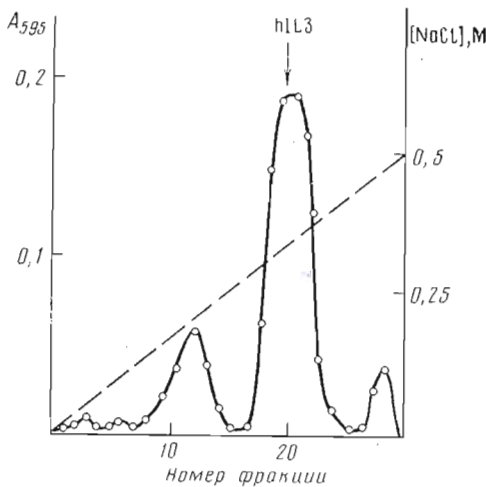


Рис. 3

Рис. 3. Хроматография препарата hIL3 на колонке с CM-Toyopearl в градиенте концентрации NaCl в буфере E. Скорость элюирования 50 мл/ч, объем фракций 1,7 мл

Рис. 4. Биологическая активность hIL3. Активация пролиферации Т-клеток человека (IL2-зависимый рост). Каждая точка представляет усредненный результат для четырех параллельных культур

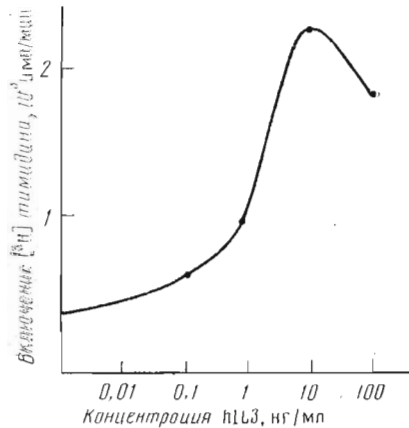


Рис. 4

pearl 650S (Toyo Soda, Япония). Использовали буферные растворы: А — 50 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (рН 8,5), 0,2 М NaCl, 5% глицерин; Б — 50 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (рН 8,5), 10 мМ EDTA, 1% тритон X-100; В — 50 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (рН 8,5), 10 мМ EDTA, 5 М мочевины; Г — 50 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (рН 8,5); Д — 50 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (рН 8,5), 5 М GpHCl; Е — 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (рН 5,0).

**Выделение hIL3.** Культуру продуцента выращивали в среде, содержащей 0,8% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта и 0,5% NaCl, в течение 18 ч при 37° С и клетки отделяли центрифугированием. 1 г влажных клеток *E. coli* суспендировали в 20 мл буферного раствора А, помещали в лед и разрушали клетки с помощью ультразвукового дезинтегратора Sonifier 240 (Branson) при А=2,0. Обработку клеток ультразвуком проводили

три раза по 20 с с интервалами в 20 с. Суспензию центрифугировали 10 мин при 10 000 g. Осадок ресуспендировали с помощью ультразвукового дезинтегратора в 20 мл буферного раствора А. После центрифугирования в течение 10 мин при 10 000 g осадок дважды отмывали как выше, но в 20 мл буферного раствора Б. Осадок отмывали еще 4 раза в буферном растворе В. После заключительной стадии отмывки осадок суспендировали в 20 мл буферного раствора Г и хранили при 4° С. После центрифугирования (5 мин при 10 000 g) hIL3 экстрагировали из осадка 20 мл буферного раствора Д в течение 10 мин при 20° С. Препарат разбавляли буферным раствором Г до конечной концентрации  $GnHCl$  0,5 М и диализовали 12 ч против двух смен того же буферного раствора. Осажденные белки отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 4000 g. pH супернатанта доводили до 5,0 постепенным добавлением 0,1 н.  $H_3PO_4$  и наносили препарат на колонку (1×10 см) с сорбентом CM-Toyorearl 650S, уравновешенным буферным раствором Е. Колонку промывали 10 мл буферного раствора Е и элюировали hIL3 линейным градиентом концентрации NaCl (0—0,5 М) в буферном растворе Е (общий объем 50 мл). Фракции, содержащие hIL3, объединяли и концентрировали в ячейке для ультрафильтрации (Amicon, США) на мембране PM-2.

офВЭЖХ проводили на приборе фирмы Waters (США), состоящем из двух насосов 501, инжектора U6k, контролера градиента 680, УФ-детектора Lambda-Max 481 и интегратора 740. Элюцию проводили в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1% TFA. Использовали колонки Nucleosil 300-5C<sub>4</sub> (4×50 мм), Nucleosil 300-7C<sub>4</sub> (10×250 мм) производства Macherey-Nagel (ФРГ).

Восстановление S—S-связей в hIL3 осуществляли в буфере Г, содержащем 50-кратный избыток дитиотреита (в расчете на S—S-связь), в течение 1—3 ч при 20° С. Удаление реагентов из препарата hIL3 проводили с использованием офВЭЖХ на колонке с Nucleosil 300-7C<sub>4</sub> (Macherey-Nagel). Полученный препарат лиофилизировали, определяли содержание тиоловых групп по методу Эллмана [10] и использовали для изучения ренатурации белка. Чувствительность анализа для тиоловых групп составляла 1 нмоль при концентрации hIL3 в анализируемой смеси 10 нМ.

Электрофорез выполняли по методу [11] в пластинках (9×12×0,04 см) 12,5% ПААГ в присутствии 0,1% SDS. Содержание hIL3 в различных препаратах определяли в гелях, окрашенных кумасси R-250, с помощью денситометрического сканирования на хроматосканере CS-930 (Shimadzu, Япония).

Концентрацию белка в растворе определяли по методу [12].

N-Концевую аминокислотную последовательность hIL3 определяли на газофазном секвенаторе фирмы Applied Biosystems (США), модель 777А, снабженном автоматическим анализатором РТН аминокислот (модель 120А этой же фирмы). Сухой образец растворяли в 25% TFA, наносили аликвоты (3×30 мкл, суммарно 100—300 пмоль белка) на фильтр реактора и высушивали каждую промежуточную аликвоту на фильтре в токе инертного газа.

Биологическую активность рекомбинантного hIL3 определяли, оценивая его способность стимулировать пролиферацию активированных Т-клеток [6]. Мононуклеарные клетки периферической крови человека выделяли в градиенте среды для выделения лимфоцитов и после необходимых отмывок культивировали 72 ч в среде RPMI-1640 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Flav Labs), содержащей фитогемагглютинин (1 мкг/мл), при плотности  $10^6$  клеток/мл. После отмывки от фитогемагглютинина клетки переводили в среду RPMI-1640 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки, содержащую рекомбинантный интерлейкин-2 (rIL2) (50 ед. акт./мл, НИК «Диагностикум») и растили при плотности  $10^5$  клеток/мл в течение 5—10 сут (1—2 пассажа). Аликвоты культуры замораживали и хранили в жидком азоте. Для тестирования hIL3 клетки после размораживания растили в течение 1—4—10 сут в среде с rIL2, затем клетки промывали и высевали на 96-луночное плато по  $5 \cdot 10^4$  клеток на лунку в объеме 100 мкл с добавлением hIL3 или без него. Клетки растили

72 ч, за 18 ч до окончания в среду добавляли [<sup>3</sup>H]тимидин (1 мкКи/лунку). Клетки осаждали на стекловолокнистые фильтры, используя полуавтоматический харвестер, и определяли количество включенного [<sup>3</sup>H]тимидина в сцинтилляционном счетчике. Результаты рассчитывали как среднее арифметическое из четырех определений. За 1 ед. акт. hIL3 принимали количество hIL3 (в 100 мкл объеме 1 лунки), вызывающее эффект, равный 50% максимальной стимуляции (см. рис. 4).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kindler V., Thorens B., Kossodo S., Allet B., Eliason J. F., Thatcher D., Farber N., Vassalli P. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 4. P. 1001-1005.
2. Ihle J. N., Keller J., Oroszlan S., Henderson L. E., Copeland D. T. // J. Immunol. 1983. V. 131. № 1. P. 282-287.
3. Гуревич А. И., Скапцова Н. В., Луценко С. В., Смирнов В. А., Куркин А. Н., Ажаев А. В. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 5. С. 647-652.
4. Weir M. P., Sparks J. // Biochem. J. 1987. V. 245. № 1. P. 85-91.
5. Jayaram B., Devor R. Guiser Y., Fiers W. // Gene. 1989. V. 79. № 1-2. P. 345-354.
6. Kimmenade A., Bond M. W., Shumacher J. H., Laguoi C. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 173. № 1. P. 109-114.
7. Marston F. A. O. // Biochem. J. 1986. V. 240. № 1. P. 1-12.
8. Harris T. J. R., Marston F. A. O., Little S., Emtage J. S., De Comer P. // Mol. Biol. Med. 1986. V. 3. № 1. P. 279-284.
9. Witer-Giannotti J. A. S., Leary A. C., Kriz R., Donahue R. E., Wong G. G., Clark S. C. // Cell. 1986. V. 47. № 1. P. 3-40.
10. Eilman G. L. // Arch. Biochem. and Biophys. 1959. V. 82. № 1. P. 70-77.
11. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 52-59. P. 680-684.
12. Bradford M. M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1, 2. P. 248-254.

Поступила в редакцию  
24.V.1991

S. V. LUTSENKO, A. I. GUREVICH, V. Yu. KANEVSKY, V. A. SMIRNOV,  
I. V. NAZIMOV\*, T. L. AZHIKINA\*, I. P. CHERNOV\*, V. M. ROSTAPSHOV\*,  
N. V. SONINA, A. V. AZHAYEV

#### ISOLATION OF RECOMBINANT INTERLEUKIN-3 PRODUCED IN *E. COLI*

«Chimtech» Ltd., Moscow:

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

A synthetic gene coding for human interleukin-3 (hIL3) was cloned in the plasmid pTE2IL3, the gene expression being controlled by the phage fd P<sub>VIII</sub> promoter and the phage T7 gene 10 translational enhancer. Under constitutive biosynthesis conditions in *E. coli*, the accumulation of recombinant hIL3 (in the inclusion bodies) was up to 30-40% of the total cell protein. An effective procedure of the hIL3 isolation is suggested. The hIL3 was solubilized in 5 M guanidinium chloride, renatured and purified to homogeneity by a single chromatographic step. The protein's yield was 34 mg/g wet cells. The isolated hIL3 showed a specific biological activity.