



УДК 577.112

© 1992 г. Н. В. Батчикова, М. А. Кулагина,
С. В. Луценко, В. А. Смирнов, В. Ю. Каневский,
Л. А. Рязанова, И. В. Назимов, Н. В. Сокина,
Е. А. Силягина, А. В. Ажаев

ЭКСПРЕССИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-4 ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ *E. COLI*. ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО БЕЛКА

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва

Сконструированы экспрессионные плазмиды *E. coli*, в которых синтетический ген интерлейкина-4 человека (hIL4) находится под контролем промотора P_{lac} . Уровень экспрессии hIL4 зависит от расстояния между участком связывания рибосомы и стартовым кодоном АТГ. Наибольшая продукция наблюдается в конструкции, где это расстояние соответствует 9 нуклеотидным парам. В бактериальных клетках hIL4 нарабатывается в виде нерастворимых включений. hIL4 был солибилизирован, ренатурирован и получен в индивидуальном виде в биологически активном состоянии с выходом 2 мг на 1 г влажных клеток.

Интерлейкин-4 человека является стимулятором роста и дифференцировки клеток иммунной системы и играет важную роль в регуляции иммунного ответа. Биологическое действие hIL4 многосторонне: он стимулирует пролиферацию активированных В-клеток, а также Т-клеток-хелперов, индуцирует секрецию IgE и экспрессию низкоаффинных IgE-рецепторов [1]. Этот белок может найти применение в медицине при заболеваниях иммунной системы, для стимуляции иммунного ответа при онкологических заболеваниях, для увеличения чувствительности иммунной системы к малым количествам антигена и пр. Для более глубокого изучения и практического применения интерлейкина-4 он требуется в количестве, которое невозможно получить из природных источников, поэтому представляется перспективным привлечение для этих целей генно-инженерных и биотехнологических методов.

В нашей лаборатории был синтезирован химико-ферментативным путем ген hIL4 человека [2]. Настоящая работа посвящена экспрессии этого гена в клетках *E. coli*.

В качестве экспрессионного вектора мы использовали коммерческую плазмиду pKK223-3 (Pharmacia). Она содержит сильный регулируемый *lac*-промотор (P_{lac}), участок связывания с рибосомами гена *lacZ* (*SD*-область), полилинкер *EcoRI-HindIII* плазмиды pUC18, а также сильный терминатор транскрипции гена *rrnB* (*rrnB* T₁T₂). Мы клонировали фрагмент *EcoRI-HindIII*, содержащий ген hIL4 [2], в полилинкерный участок pKK223-3 по соответствующим сайтам и получили плазмиду pKKhIL4-12 (рис. 1). Этой плазмидой трансформировали клетки *E. coli* TG1 и рекомбинантный штамм (TG1/pKKhIL4) выращивали в присут-

Сокращения: GlnHCl — хлоридат гуанидина, SDS — додецилсульфат натрия, TFA — трифторуксусная кислота, ДТТ — дитиотреит, ФГА — фитогемагглютинин, FCS — эмбриональная телячья сыворотка, IPTG — изопропил- β -D-тиогалактозид, РТН — фенилтиогидантоин, RBS — участок связывания рибосомы. В формулах олигонуклеотидов префикс «ad» опущен.

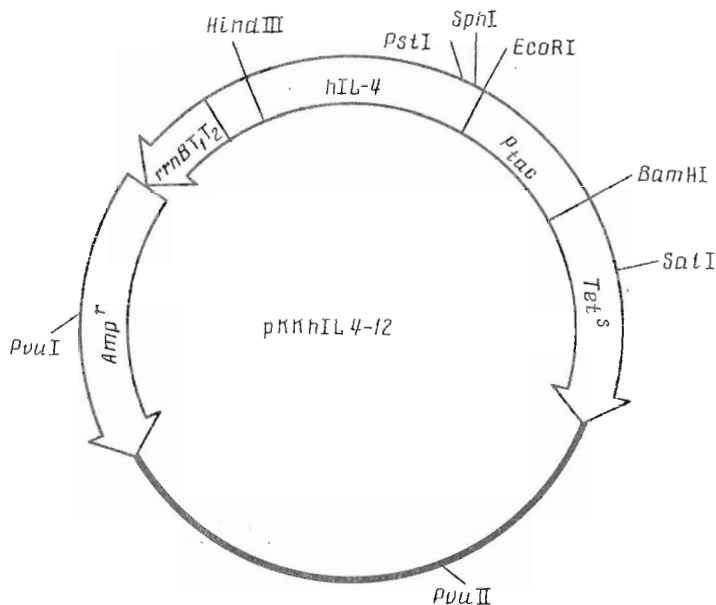


Рис. 1. Плазмида рККhIL4-12, в которой клонирован ген hIL4. Указаны сайты рестриктаз, положение промотора P_{tac} , терминаторов $rrnB T_1$ и T_2 и генов резистентности к антибиотикам

ствии IPTG. Целевой белок в этих клетках практически не нарабатывается (рис. 2).

Экспрессия гена зависит от многих факторов: силы промотора, стабильности мРНК, эффективности трансляции и устойчивости целевого белкового продукта к действию внутриклеточных протеиназ. Наиболее вероятная причина отсутствия интерлейкина в данном случае — низкая эффективность процесса трансляции.

Одним из факторов, влияющих на эффективность трансляции, является расстояние между RBS и стартовым кодом ATG [3]. Изменение этого расстояния может резко увеличить уровень экспрессии гена. Исходя из плазмиды рККhIL4-12, где стартовый кодон ATG удален от RBS на 12 п.о., мы сконструировали плазмиды рККhIL4-10 и рККhIL4-9, в которых расстояние между RBS и ATG составляет 10 и 9 п.о. соответственно. Нуклеотидные последовательности участков трех плазмид, включающие RBS и начало структурного гена, приведены на рис. 3. Плазмида рККhIL4-10 получена путем расщепления рККhIL4-12 ферментами *EcoRI* и *SphI* и лигирования вектора с гептануклеотидом (5')ААТТСАТГ. Для конструирования плазмиды рККhIL4-9 исходную рККhIL4-12 обрабатывали рестриктазами *EcoRI* и *PstI* и вектор лигировали с синтетическими олигонуклеотидами (5')ААТТАТГСАТАААТ·GCGАСАТСАСССТГСА и (5')GGGTGATGTCGCАТТТАТГСАТ. Полученными плазмидами трансформировали клетки *E. coli* TG1 и рекомбинантные штаммы выращивали в условиях индукции *tac*-промотора.

Уровень экспрессии hIL4 в трех рекомбинантных штаммах и молекулярную массу hIL4 оценивали методом электрофореза тотальных клеточных белков в SDS-ПААГ. В качестве контроля использовали клетки TG1, трансформированные плазмидой рКК223-3. Как видно из рис. 2, в клетках, содержащих плазмиды рККhIL4-10 и рККhIL4-9, нарабатывается полипептид с молекулярной массой ~15 кДа, который отсутствует в клетках, несущих плазмиды рКК223-3 и рККhIL4-12. Количество это-

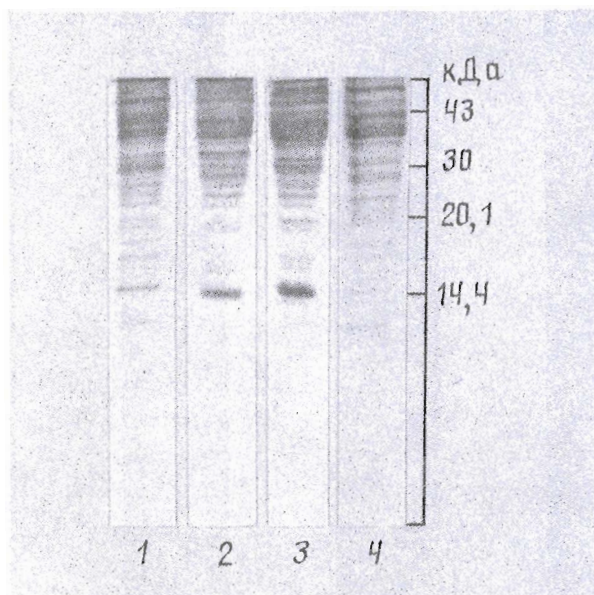


Рис. 2. Электрофорез лизатов рекомбинантных штаммов клеток *E. coli* TG1, несущих варианты плазмиды рККhIL4. 1 – рККhIL4-12, 2 – рККhIL4-10, 3 – рККhIL4-9, 4 – контроль – штамм TG1 с плазмидой рКК223-3

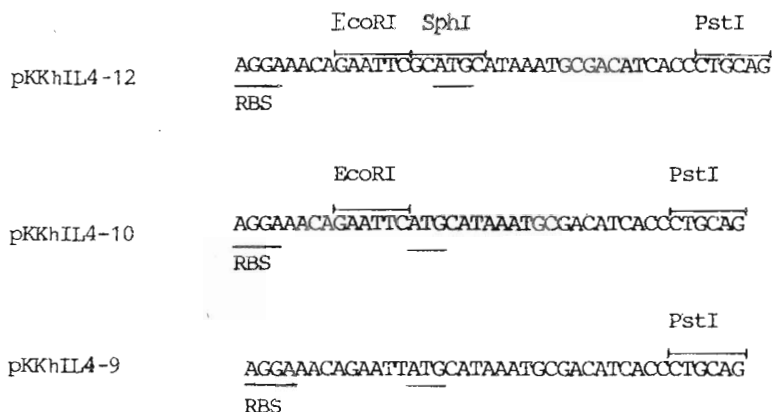


Рис. 3. Фрагменты нуклеотидных последовательностей плазмид рККhIL4-12, рККhIL4-10 и рККhIL4-9, включающие в себя область между RBS и стартовым кодоном ATG и начало структурного гена. RBS и ATG подчеркнуты. Указано положение сайтов рестриктаз

го полипептида увеличивается с уменьшением расстояния между RBS и стартовым кодоном ATG и достигает максимума в клетках, содержащих плазмиду рККhIL4-9. Молекулярная масса этого полипептида соответствует теоретическому для hIL4 (14,8 кДа).

Полученный нами штамм TG1/рККhIL4-9 был использован для выделения hIL4. hIL4 нарабатывается в клетках *E. coli* в виде телец включения – белковых конгломератов неупорядоченной структуры. Тельца включения обладают низкой растворимостью в различных буферных системах, содержащих в невысоких концентрациях детергенты и соли. Это

Очистка и ренатурация hIL4

Препарат по стадиям очистки	Общий белок, мг	Общий объем, мл	hIL4, мг	Чистота, %	Очистка (раз)	Выход, %
Клеточный лизат *	77	20	3,1	4	1	100
Экстракт	20	20	3,0	15	3,8	96,8
Фильтрат после фенол-сефарозы	10	150	2,8	28	7	90,3
Препарат после диализа (ренатурация)	7	160	2,5	35,7	8,9	80,6
CM-Toyorearl	2	8,6	2,0	99	24,5	64,5

* 1 г влажных клеток *E. coli* лизировали в 8 М GnHCl и определяли содержание hIL4 по данным денситометрического сканирования гелей.

создает определенные преимущества при выделении целевого продукта, позволяя уже на первых стадиях очистки устранить основную массу клеточных белков. С другой стороны, для получения препарата, обладающего биологической активностью, в растворимом виде необходимо проведение сложных и плохо изученных процессов ренатурации белка.

Первой стадией очистки hIL4 является выделение телец включения. Очевидно, что степень чистоты телец включения hIL4 во многом определяет успех всей дальнейшей работы. В опубликованных ранее работах [4, 5] по выделению hIL4 не придавалось существенного значения очистке телец включения hIL4, что приводило к усложнению процесса выделения белка и его потерям в процессе ренатурации вследствие соосаждения с примесными белками. Нам удалось этого избежать путем отмывок телец включения буферными растворами, содержащими тритон X-100 и мочевины. Такая обработка сопровождалась минимальными потерями целевого белка (таблица) и позволила получить hIL4 в достаточно чистом виде еще в составе телец включения (рис. 4, дорожка 2).

Для солиubilизации телец включения hIL4 авторы работы [4] использовали раствор хлорида магния. Мы полагаем, что лучшие результаты дает использование 5 М GnHCl. Применение этого агента позволило полностью солиubilизировать hIL4 и в дальнейшем вести очистку белка с одновременной его ренатурацией.

Препарат солиubilизованного hIL4 разбавляли до конечной концентрации GnHCl 1 М и инкубировали раствор 1,5 ч. В процессе инкубации значительная часть остаточных балластных белков выпадала в осадок, который удаляли центрифугированием; при этом практически весь hIL4 находился в супернатанте (рис. 4, дорожки 3, 4). Для проведения гидрофобной хроматографии в супернатант добавляли ацетонитрил до конечной концентрации 15%, инкубировали 30 мин и осадок балластных белков отделяли центрифугированием. При хроматографии на фенол-сефарозе hIL4 не удерживался сорбентом, тогда как значительная часть примесей оставалась на колонке (рис. 4, дорожка 5). Полученный элюат диализовали против 1000-кратного объема 10 мМ Na₂HPO₄ (рН 8) (раствор Г). Эта стадия существенна для формирования внутримолекулярных дисульфидных связей и ренатурации белка. В процессе диализа наблюдалось образование осадка, содержащего преимущественно примеси. Осаждение некоторого количества hIL4, по-видимому, обусловлено его ассоциацией с примесными белками. После данной стадии очистки препарат содержал лишь минорные примеси балластных белков (рис. 4, дорожка 6).

После завершения диализа препарат был полностью ренатурирован. Для оценки ренатурации мы использовали хроматографические кри-

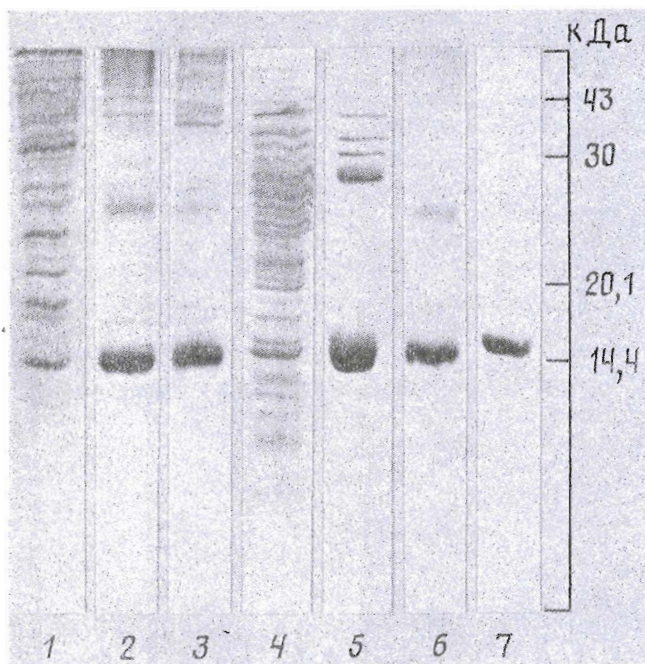


Рис. 4. Электрофорез в ПААГ препаратов hIL4 на различных стадиях очистки. 1 — клеточный лизат, 2 — hIL4 из телец включения, 3 — экстракт 5 М GnHCl, 4 — осадок после инкубации препарата в 1 М GnHCl, 5 — элюат с фенол-сефарозы, 6 — препарат после диализа, 7 — элюат с CM-Toyorearl

терии и данные о биологической активности препарата. Как видно на рис. 5, время удерживания полученного hIL4 на колонке при обращенно-фазовой хроматографии соответствует времени удерживания ренатурированного белка. Препарат hIL4 после ренатурации проявлял значительную биологическую активность — $3 \cdot 10^6$ ед./мг, чего не наблюдалось на ранних стадиях очистки белка. С помощью метода Элмана в препарате hIL4 после диализа свободных тиольных групп не обнаруживалось, тогда как на стадии фильтрации через фенол-сефарозу тем же методом выявлялось четыре тиольных группы на молекулу hIL4. Представленные данные указывают на то, что при постепенном удалении денатурирующего агента в молекуле hIL4 происходит автоокисление SH-группы с формированием дисульфидных связей, в результате чего белок приобретает нативную конформацию.

После заключительной стадии очистки — ионообменной хроматографии на колонке с CM-Toyorearl (рис. 6) и рехроматографии на колонке с Nucleosil 300-5C (рис. 7), по данным интегрирования хроматографических пиков (рис. 7) и SDS-электрофореза (рис. 4, дорожка 7), чистота полученного hIL4 составляла $>99\%$.

Полученный препарат hIL4 хранили в буферном растворе Г 2 недели при 4°C и несколько месяцев при -20 или -70°C . При указанных условиях хранения изменений биологической активности hIL4 не наблюдалось. 15-Кратное замораживание-оттаивание препарата также не снижало биологическую активность hIL4.

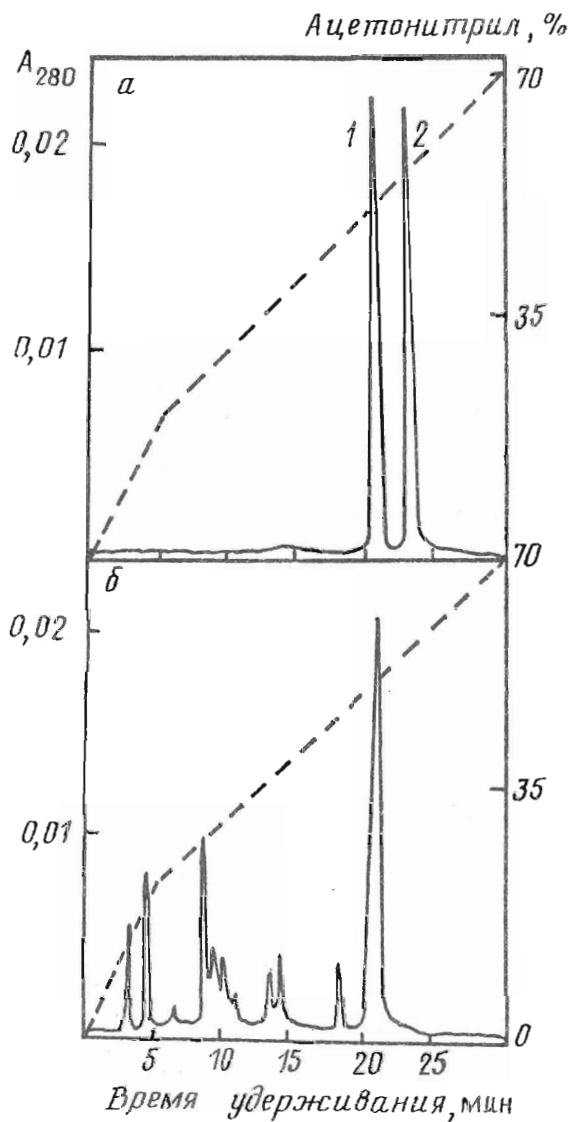


Рис. 5. Разделение hIL4 на колонке с Nucleosil 300-5C. а — препарат ренатурированного (1) и денатурированного (2) hIL4; б — препарат после диализа

Результаты очистки hIL4 приведены в таблице. hIL4 был очищен более чем в 20 раз и обладал удельной активностью $>10^6$ ед./мг (рис. 8); его выход составил 64,5%.

По данным аминокислотного секвенирования, полученный hIL4 имеет N-концевую последовательность Met-His-Lys-Cys-Asp-Ile-Thr-Leu, что соответствует последовательности интерлейкина-4 человека с дополнительным Met.

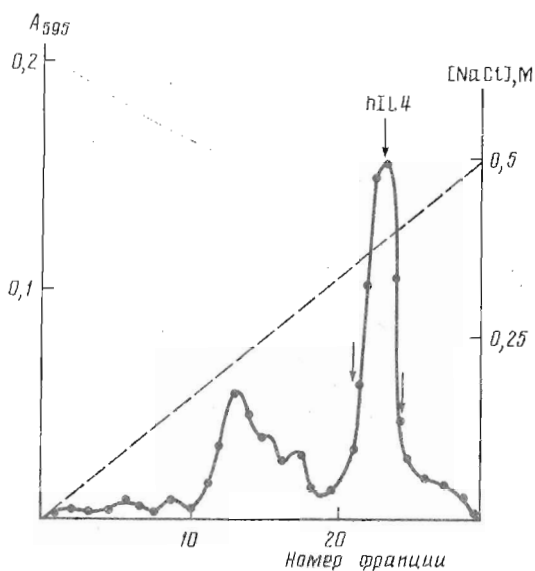


Рис. 6. Хроматография препарата hIL4 на колонке с CM-Toyorearl. Скорость элюирования 50 мл/ч, объем фракций 1,7 мл

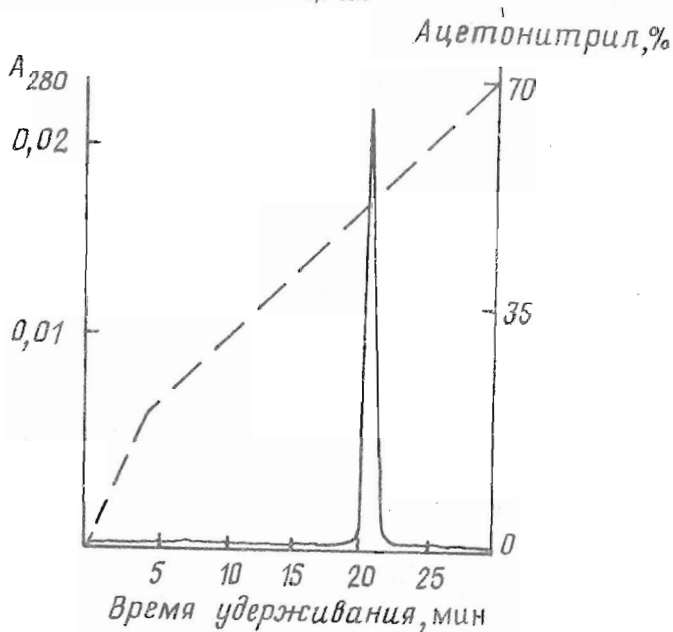


Рис. 7. Аналитическое разделение hIL4 на колонке Nucleosil 300-5C. Скорость потока 1 мл/мин

Экспериментальная часть

Использовали агарозу, АТФ, бромистый этидий, трис, акриламид, N,N' -метиленбисакриламид, дитиотреит, SDS, EDTA, персульфат аммония, мочевины, кумасси R-250, $GnHCl$, $MgCl_2$, Na_2HPO_4 (Sigma, США), агар (Bio-Rad, США), ксиленианоловый голубой, бромфеноловый синий (Serva, ФРГ), тритон X-100, триптон, дрожжевой экстракт (Difco,

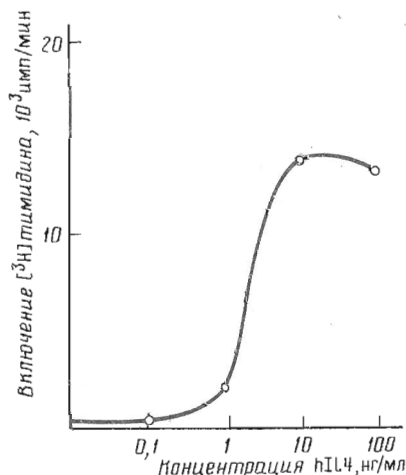


Рис. 8. Активация пролиферации Т-клеток человека hIL4. Т-клетки человека растили с плотностью $5 \cdot 10^6$ клеток на лунку в присутствии различных концентраций hIL4 или без него (контроль) в течение 72 ч (последние 18 ч с добавлением $[^3\text{H}]$ тимидина). Каждая точка представляет усредненный результат для четырех параллельных культур

США), 2-меркаптоэтанол (Fluka, Швейцария), набор белков-стандартов для электрофореза, фенил-сефарозу (Pharmacia, Швеция), ацетонитрил и TFA (Merck, ФРГ), CM-Touoreal 850S (Toyo Soda, Япония).

Ферменты: ДНК-лигаза фага T4 (НПО «Фермент», Вильнюс), рестрикционные эндонуклеазы *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *SphI* (PL Biochemicals, Англия), лизоцим (Sigma).

Плазмидную ДНК выделяли методом быстрого лизиса [6] и анализировали обработкой рестриктазами в стандартных условиях [7].

Электрофорез ДНК в агарозных гелях проводили по методу, описанному в руководстве [8]. Использовали 0,8–2,5% агарозные гели.

Элюция ДНК из легкоплавкой агарозы. После идентификации нужного фрагмента ДНК в агарозном геле кусок геля под фрагментом вырезали и в образовавшуюся выемку заливали раствор 0,5% легкоплавкой агарозы в буфере TAE (40 mM трис, 20 mM ацетат натрия, 1 mM EDTA, pH 7,6). После застывания легкоплавкой агарозы электрофорез продолжали до тех пор, пока фрагмент не входит в зону легкоплавкой агарозы. Затем кусок геля, содержащий фрагмент ДНК, вырезали и элюировали по методу Вайсландера [9].

Фрагменты ДНК лигировали в стандартных условиях, описанных в руководстве [8].

Синтез олигонуклеотидов вели как описано в работе [10]. В реакции конденсации вводили 1,8-дизабцикло [5.4.0]ундецен-7-овые соли защищенных нуклеозид-3'-гидрокси-5'-фитов.

Реципиентные штаммы *E. coli* трансформировали по методу, описанному Нсаном с соавт. [11].

Лизис *E. coli* для анализа клеточных белков. Клетки *E. coli* из 1 мл бактериальной культуры осаждали при 5000 об/мин, суспендировали в буфере, содержащем 10 mM трис-HCl (pH 6,8), 3% SDS, 1% меркаптоэтанол, 20% глицерина, и разрушали клетки методом кипячения и замораживания.

Буферные растворы: А – 50 mM Na_2HPO_4 (pH 8,0), 10 mM EDTA, 5% глицерин; Б – 50 mM Na_2HPO_4 (pH 8,0), 10 mM EDTA, 5% тритон

X-100; В — 50 мМ Na_2HPO_4 (рН 8,0), 10 мМ EDTA, 5 М мочевины; Г — 10 мМ Na_2HPO_4 (рН 8,0); Д — 10 мМ Na_2HPO_4 (рН 8,0), 5 М GnHCl , 1 мМ EDTA; Е — 10 мМ Na_2HPO_4 (рН 8,0), 1 М GnHCl , 1 мМ EDTA, 15% ацетонитрил.

Бактериальная культура. Для продукции hIL4 использовали штамм *E. coli* TG1 (Pharmacia, Швеция), трансформированный плазмидой pKKhIL4-9. Бактерии выращивали при 37° С в YT-бульоне (0,8% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 0,5% NaCl) в присутствии ампициллина (50 мкг/мл) до A_{550} 1,0. Синтез hIL4 индуцировали добавлением IPTG (1 мМ) и через 4 ч роста при 37° С собирали клетки центрифугированием (6000 об/мин, 4° С, 15 мин).

Выделение hIL4. 1 г влажных клеток *E. coli* суспендировали в 20 мл буферного раствора А, помещали в лед и разрушали клетки с помощью ультразвукового дезинтегратора Sonifier 250 (Branson). Обработку клеток проводили при А 3,0 (3 раза по 10 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 (10 мин при 10 000 g) осадок четырежды отмывали как описано выше, но в 20 мл буферного раствора В. Отмывку осадка проводили 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 (10 мин при 10 000 g) hIL4 экстрагировали из осадка 20 мл буферного раствора Д в течение 20 мин при 20° С. Препарат разбавляли буферным раствором Г до конечной концентрации GnHCl 1 М, раствор инкубировали 1,5 ч при 20° С и добавляли ацетонитрил до конечной концентрации 15%. После инкубации в течение 30 мин осадок удаляли центрифугированием (5 мин при 10 000 g). Супернатант фильтровали через колонку (1×10 см) с фенол-сефарозой, уравновешенной буферным раствором Е, с последующим досыпанием hIL4 тем же буфером. Элюат диализовали против двух смен буферного раствора Г в течение 12 ч и центрифугировали 15 мин при 10 000 g. Супернатант наносили на колонку (1×10 см) с CM-Toyopearl 650S, уравновешенным буферным раствором Г. Колонку промывали 10 мл буферного раствора Г и элюировали hIL4 линейным градиентом NaCl (0–0,5 М) в буферном растворе Г. Фракции, содержащие hIL4, объединяли и хроматографировали на колонке с носителем Nucleosil 300-7C в градиенте ацетонитрила в 0,1% TFA. Детекцию hIL4 во фракциях на всех стадиях очистки осуществляли с помощью электрофореза в 12,5% ПААГ в присутствии SDS.

Восстановление S–S-связей в hIL4 проводили в буфере Г, содержащем 50-кратный избыток ДТТ (в расчете на S–S-связь), в течение 1–3 ч при 20° С. Реагенты из препарата hIL4 удаляли с использованием ОФ-ВЭЖХ на колонке с Nucleosil 300-5C. Белок элюировали с помощью градиента ацетонитрила (0–70%) в 0,1% TFA. Полученный препарат лиофилизировали, определяли содержание тиольных групп по методу [12] и использовали в качестве стандарта восстановленного hIL4. Чувствительность анализа для тиольных групп составляла 1 нМ при концентрации hIL4 в анализируемой смеси, равной 10 мМ.

Определение биологической активности hIL4. Стимуляция пролиферации активированных Т-лимфоцитов человека (см. работу [5]). Из дефибринированной крови здорового донора с помощью центрифугирования в градиенте среды для выделения лимфоцитов были выделены мононуклеарные лимфоциты. После необходимых отмывок клетки культивировали в среде RPMI-1640 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS) добавлением ФГА до 1 мкг/мл при плотности 10 кл./мл в течение 72 ч. После отмывания ФГА клетки переводили в среду RPMI-1640

с 10% FCS с добавлением 50 ед./мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (гIL2) («Диагностикум», Москва) и растили при плотности 10^5 клеток на 1 мл в течение 10 сут (1–2 пассажа). Аликвоты культуры замораживали и хранили в жидком азоте. Перед тестированием hIL4 клетки после размораживания растили 4 сут в среде с 20 ед./мл гIL2. Полученная культура Т-лимфоцитов высокочувствительна в тесте активации пролиферации под действием hIL4. Для тестирования клетки переносили в среду RPMI-1640 с 10% FCS без гIL2 и высевали на 96-луночное плато по $5 \cdot 10^4$ клеток на лунку в объеме 100 мкл с добавлением нескольких разведений hIL4 или без него. Клетки росли 72 ч, в течение последних 6 или 18 ч – с добавлением в среду [3 H]тимидина (1 мкКи на лунку). Клетки осаждали на фильтры GFC (Whatman), используя полуавтоматический харвестер, и определяли количество включенного [3 H]тимидина с помощью сцинтилляционного счетчика. Результирующей величиной включения считали среднюю арифметическую значений включения в четырех параллельных культурах. За единицу активности hIL4 принимали количество hIL4 (в 100 мкл объема одной лунки), вызывающее эффект, равный 50% максимальной стимуляции.

На рис. 8 приведен график зависимости включения [3 H]тимидина в клетки от концентрации hIL4.

Электрофорез проводили по методу [13] в пластинах (9×12×0,04 см) 12,5% ПААГ в присутствии 0,1% SDS. Количественное определение содержания hIL4 в различных препаратах проводили в окрашенных ку-массе R-250 гелях с помощью денситометрического сканирования на хроматосканере CS-930 (Shimadzu, Япония).

Концентрацию белка в растворе определяли по методу [14]. Определение аминокислотной последовательности hIL4 проводили на газо-фазном секвенаторе фирмы Applied Biosystems (США), модель 777 А, снабженном автоматическим анализатором ФТГ аминокислот (модель 120 А этой же фирмы). Сухой образец растворяли в 25% ТФА, наносили аликвоты (3×30 мкл, суммарно 100–300 нмоль белка) на фильтр реактора и высушивали каждую промежуточную аликвоту на фильтре в токе инертного газа. После проведения восьми циклов отщепления идентифицировали природу аминокислот.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. O'Garra A., Umland S. // Immunology Today. 1988. V. 9. № 2. P. 45–54.
2. Кулагина М. А., Скапцова Н. В., Батчикова Н. В., Куркин А. Н., Ажаев А. В. // Биооргани. химия. 1990. Т. 16. № 5. С. 625–634.
3. Sato N., Hayami T., Murata K., Watanabe K., Kariya Y., Sakaguchi M., Kimura S., Nonaka M., Kimura A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1989. V. 30. № 2. P. 153–159.
4. Jayaram B., Devor R., Guiser Y., Fiers W. // Gene. 1989. V. 79. № 1–2. P. 345–354.
5. Kimmenade A., Bond M. W., Shumacher J. M., Lagou C. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 173. P. 109–114.
6. Birnboim H. C., Doly J. // Nucl. Acids Res. 1979. V. 7. № 6. P. 1513–1522.
7. Roberts R. J. // Gene. 1978. V. 4. № 3. P. 183–194.
8. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. // Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor: CSH Laboratory, 1982.
9. Wieslander L. // Anal. Biochem. 1979. V. 98. № 2. P. 305–309.
10. Скапцова Н. В., Куркин А. Н., Ажаев А. В. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. № 7. С. 940–946.
11. Cohen C. N., Chang A. C. Y., Hsu L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. V. 69. № 8. P. 2110–2114.
12. Ellman G. L. // Arch. Biochem. and Biophys. 1959. V. 82. № 1. P. 70–77.
13. Laemmli V. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
14. Bradford M. M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1–2. P. 248–254.

Поступила в редакцию
19.IX.1991

N. V. BATCHIKOVA, M. A. KULAGINA, S. V. LUTSENKO, V. A. SMIRNOV,
V. Ju. KANEVSKY, L. A. RYAZANOVA, I. V. NAZIMOV, N. V. SONINA,
E. A. SINYAGINA, A. V. AZHAYEV

**EXPRESSION OF THE HUMAN INTERLEUKIN-4 SYNTHETIC GENE
IN *E. COLI* CELLS. ISOLATION OF THE BIOLOGICALLY
ACTIVE PROTEIN**

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

Expression *E. coli* plasmid were constructed in which the human interleukin-4 (hIL4) synthetic gene is controlled by tac promotor. The expression level of the gene depends on the distance between RBS and the initial codon ATG, with the maximal production in case of the nine base paire distance. The recombinant protein, accumulated in the inclusion bodies, was solubilized, renaturated, and purified to homogeneous, biologically active preparation, the yield being 2 mg/g wet cells.