



УДК 577.122

© 1992 г. Н. В. Ватчикова, И. В. Альтман, С. В. Луценко,  
В. А. Смирнов, И. В. Назимов\*, Л. Г. Экинд,   
Е. А. Сипягина, А. В. Ажаев

## СЕКРЕЦИЯ В ПЕРИПЛАЗМУ РЕКОМБИНАНТНОГО ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

Совместное малое предприятие «Химтек»,  
\* Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва

Сконструирована серия секреторных векторов, в которых синтетический ген эпидермального фактора роста человека (hEGF), состыкованный с геном, кодирующим лидерный пептид одного из основных белков внешней мембраны *E. coli*, OmpF, находится под контролем промотора  $P_{lac}$ . Повышение выхода целевого продукта достигается путем увеличения копий рекомбинантного гена. В бактериальных клетках hEGF секретируется в периплазматическое пространство. Целевой белок выделен в состоянии, близком к гомогенному (>98%) с использованием ОФ-хроматографии. Выход составил 7 мг/л бактериальной культуры. N-Концевая аминокислотная последовательность (25 аминокислот) полученного hEGF соответствует природной. Препарат обладает биологической активностью.

Эпидермальный фактор роста человека (hEGF), он же урогастрон, участвует в ряде физиологических процессов, связанных с эмбриональным ростом и регенерацией тканей [1].

hEGF представляет собой полипептид, состоящий из 53 аминокислотных остатков и содержащий 3 дисульфидные связи. Ранее [2] мы осуществили химико-ферментативный синтез гена hEGF с учетом наиболее часто используемых в *E. coli* кодонов. Синтетический ген hEGF, содержащий 165 нуклеотидных пар (53 кодона аминокислот и 2 стоп-кодона) и имеющий «липкие концы» сайтов рестриктаз *EcoRI* (5') и *BamHI* (3'), был клонирован в составе pUC18. При этом ген hEGF попадает в рамку считывания  $\beta$ -галактозидазы, и плазмида pUC18/hEGF кодирует hEGF в составе гибридного белка с 5 аминокислотными остатками  $\beta$ -галактозидазы на N-конце. В клетках *E. coli* JM105, трансформированных этой плазмидой, выращенных в присутствии IPTG, целевой продукт не обнаруживается (данные не опубликованы). Причиной, по-видимому, является известная нестабильность чужеродного низкомолекулярного белка в клетках *E. coli* при продукции его в цитоплазму.

Стабильность чужеродного полипептида в клетках *E. coli* может быть повышена путем выведения целевого продукта из зоны действия цитоплазматических протеиназ, т. е. с помощью секреции его в периплазматическое пространство или в культуральную среду.

Настоящая работа посвящена экспрессии гена hEGF в составе секреторных векторов, содержащих ген лидерного пептида белка OmpF, одного из основных белков внешней мембраны *E. coli*.

Ген *ompF* представлен в хромосоме *E. coli* одной копией и находится под контролем сильного индуцируемого промотора со сложной системой

Сокращения: hEGF – эпидермальный фактор роста человека; IPTG – изопропил  $\beta$ -D-тиогаляктозид, ОФ – обращенно-фазовая, МВ-нуклеаза – нуклеаза золотистой фасоли (*mung bean*), префикс «d» в формулах олигонуклеотидов опущен.

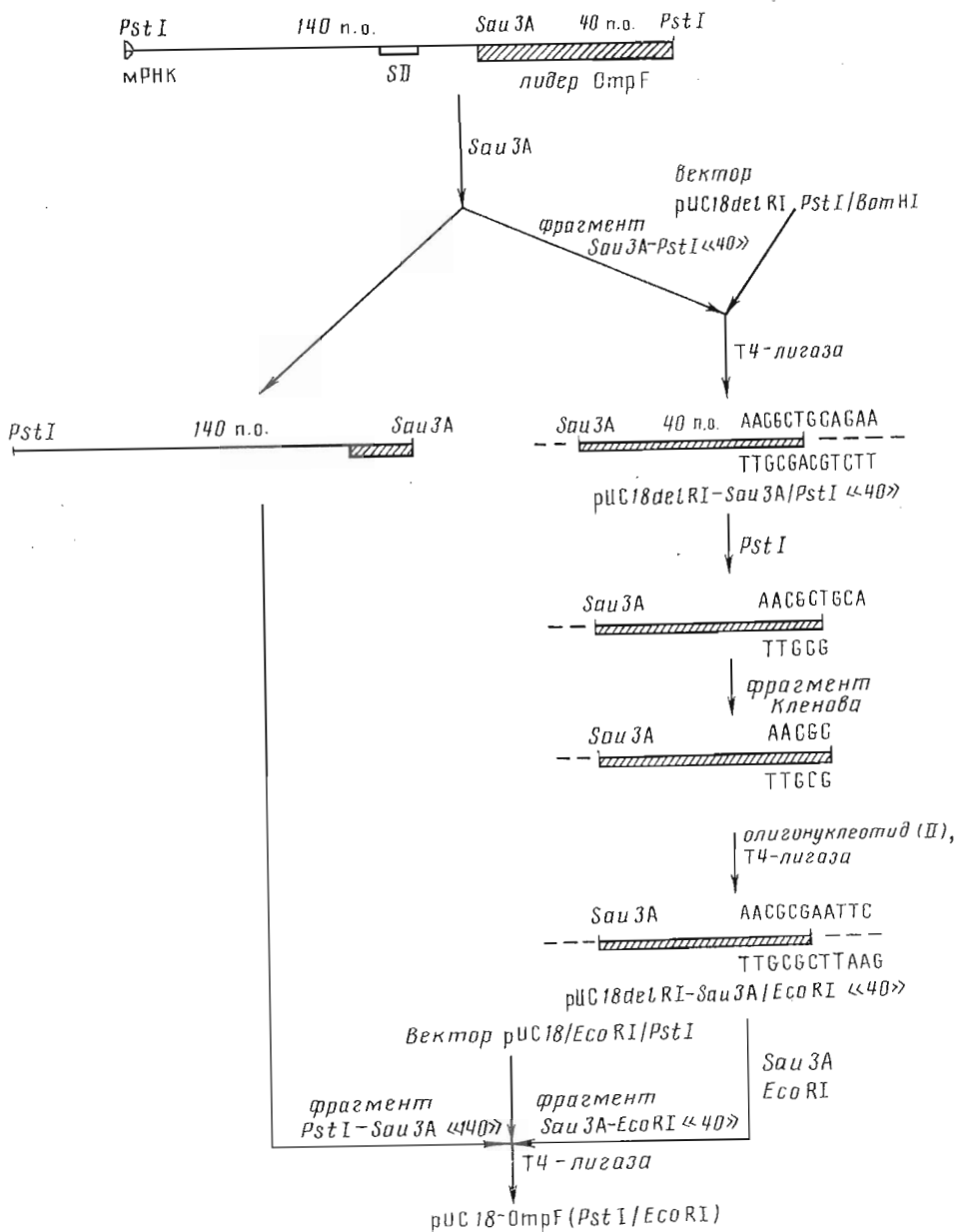


Рис. 1. Схема конструирования плазмиды pUC18-OmpF/PstI/EcoRI из фрагмента PstI-PstI гена *ompF*. Заштрихована последовательность, кодирующая лидерный пептид OmpF; пунктиром обозначена ДНК векторных плазмид

регуляции [3-6]. На эффективность его экспрессии влияет ряд факторов культуральной среды, например осмос, pH и температура. При полной индукции синтез белка OmpF достигает примерно  $10^5$  молекул на клетку [6], что, по-видимому, объясняется не только силой промотора, но и приспособленной к высокой экспрессии областью инициации трансляции. Нуклеотидная последовательность гена *ompF* известна [5]. Участок, кодирующий 5'-конец *ompF* мРНК от старта транскрипции до места стыка кодонов лидерного пептида и зрелой части белка, находится в составе PstI-PstI-фрагмента (180 п.о.) этого гена. Таким образом, легко осуще-

ствляется стыковка чужеродного гена с геном лидерного пептида *OmpF* и всего гибридного гена под контроль сильного регулируемого промотора *E. coli*, который более удобен в работе по сравнению с промотором *OmpF*.

Указанный фрагмент был выделен нами из хромосомы *E. coli* штамма С600. Далее дистальный (по ходу трансляции) сайт *PstI* был заменен нами на сайт *EcoRI* (плазмида pUC18-*OmpF* (*PstI/EcoRI*) (см. рис. 1 и «Экспериментальную часть») так, чтобы при последующем лигировании по сайту *EcoRI* синтетический ген *hegf* попадал в рамку считывания лидерного пептида *OmpF*. При этом первый кодон гена hEGF точно стыкуется с последним кодоном гена лидерного пептида.

В качестве вектора использована плазмида pKKD, содержащая промотор  $P_{lac}$ , полилинкерный участок и терминатор транскрипции гена *rnnB*, которая представляет собой модифицированную нами коммерческую плазмиду pKK223-3 (PharMacia). Модификация заключалась в элиминация сайтов рестриктаз *BamHI* и *Sall* в составе участка, происходящего из pBR322, а также в замене части полилинкера на синтетическую последовательность, в которой вместо сайтов рестриктаз *EcoRI*, *SmaI*, *BamHI* и *Sall* появляется сайт *XhoI*, при этом сайты *PstI* и *HindIII* сохраняются.

Плазмида pBT-hEGF, схема которой представлена на рис. 2, получена трехкомпонентным лигированием фрагмента *PstI-EcoRI* (участок гена *ompF*), фрагмента *EcoRI-HindIII* из pUC18-hEGF (ген *hegf*) и векторного фрагмента *PstI-HindIII* из pKKD. Штамм *E. coli* JM105, трансформированный плазмидой pBT-hEGF, выращивали в условиях индукции *tac*-промотора в минимальной среде. В качестве контроля использовали штамм JM105, трансформированный плазмидой pKKD. Из клеток указанных штаммов получали периплазматические фракции (см. «Экспериментальную часть») и анализировали их с помощью SDS-гель-электрофореза. Как видно из рис. 3, в препарате, полученном из клеток, содержащих плазмиду pBT-hEGF, присутствует дополнительная полоса с молекулярной массой примерно 7 кДа, что соответствует hEGF. Присутствие hEGF-иммунореактивного материала в периплазматической фракции белков опытного штамма обнаруживается также dot-методом с помощью антител на hEGF. По данным иммуоферментного анализа, проводимого с помощью поликлональных антител на hEGF, продукция hEGF в периплазму клеток штамма JM105/pBT-hEGF составляет 3,5–4,5 мг/л бактериальной культуры.

Целевой белок был выделен из периплазматической фракции клеток штамма JM105/pBT-hEGF в аналитических количествах путем сорбции на мини-колонке с SepPack C18 и ВЭЖХ. N-Концевая аминокислотная последовательность выделенного белка совпадает с соответствующей последовательностью hEGF.

Полученный результат свидетельствует о том, что гибридный белок-предшественник, кодируемый плазмидой pBT-hEGF, правильно процессируется сигнальной пептидазой *E. coli*, несмотря на изменение сайта процессинга по сравнению с *OmpF*. Чтобы проверить, влияет ли такое изменение на эффективность отщепления лидерного пептида, мы сконструировали плазмиду pBTN-hEGF, которая отличается от pBT-hEGF наличием последовательности, кодирующей 12 аминокислотных остатков N-концевой части зрелого *OmpF* и динептид -LysLys- между этой последовательностью и hEGF (рис. 2). В этой конструкции сайт процессинга сигнальной пептидазой соответствует природному, а динептид -LysLys- предусмотрен как сайт протеолитического расщепления при выделении целевого продукта из гибридного белка.

Штамм JM105, трансформированный плазмидой pBTN-hEGF, выращивали в тех же условиях, что и JM105/pBT-hEGF, выделяли периплазматическую фракцию. Электрофорез белков в SDS-ПААГ показал наличие

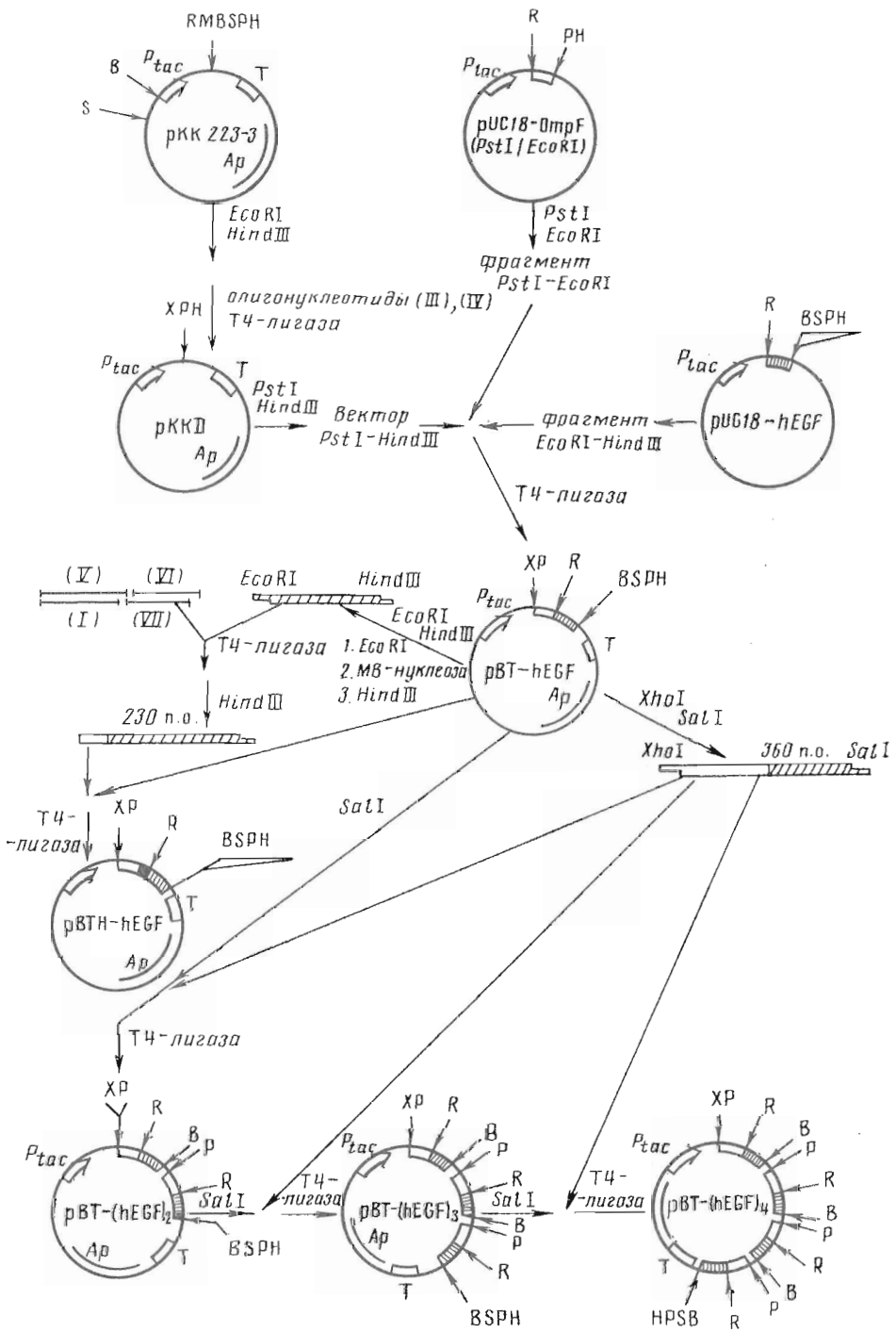


Рис. 2. Схема конструирования плазмид pBT-hEGF, pBTn-hEGF и серии pBT-(hEGF)<sub>n</sub>, где n=2-4. Указаны сайты рестриктаз: R - EcoRI, M - SmaI, B - BamHI, S - SalI, P - PstI, H - HindIII, X - XhoI. Светлые прямоугольники - участки, соответствующие гену *ompF*; заштрихованные - участки, соответствующие гену *hEGF*. Зачерненный участок соответствует 42 кодонам N-концевой части зрелого OmpF. Указано положение промотора ( $P_{tac}$  или  $P_{tac}$ ) и области терминации транскрипции гена *rnaB* (T)

Штамм-продуцент	Продукция hEGF, мг/л культуры	
	периплазма	среда
JM105/pBT-hEGF	3,5–4,5	1,0–2,0
JM105/pBT-(hEGF) <sub>2</sub>	9,5–10,5	3,0–3,5
JM105/pBT-(hEGF) <sub>3</sub>	10,0–11,0	5,0–5,5
JM105/pBT-(hEGF) <sub>4</sub>	9,0–10,0	6,0–7,0
JM105/pBTN-hEGF	10,0–12,0	1,5–2,0

в этом препарате белка с молекулярной массой примерно 8 кДа, что соответствует теоретическому значению для правильно процессированного гибридного белка OmpF-LysLys-hEGF. Присутствие hEGF-подобного белка в периплазматической фракции JM105/pBTN-hEGF подтверждают dot-метод с помощью антител на hEGF и иммуоферментный анализ. По данным последнего, pBTN-hEGF обеспечивает секрецию целевого белка в периплазму в количестве 10–12 мг/л бактериальной культуры (в расчете на hEGF). Таким образом, изменение сайта процессинга в области начала зрелого белка, а именно замена собственной последовательности OmpF на чужеродную hEGF, приводит к снижению уровня секреции рекомбинантного продукта более чем вдвое.

Как продуцент, штамм JM105/pBTN-hEGF не выгоден для получения hEGF, поскольку в нем в периплазму секретируется гибридный белок OmpF-hEGF. Необходимость дополнительных стадий по расщеплению полипептидной цепи и разделению продуктов протеолиза является большим недостатком этого штамма, несмотря на повышенный, по сравнению с JM105/pBT-hEGF, уровень секреции рекомбинантного белка.

Плазмида pBT-hEGF, в которой ген лидерного пептида белка OmpF точно состыкован с геном hEGF, более перспективна в биотехнологическом плане, а повышения выхода целевого продукта можно добиться другим путем — увеличением числа копий рекомбинантного гена. Мы сконструировали серию плазмид pBT-(hEGF)<sub>n</sub>, где n=2–4. Для этого фрагмент XhoI-SalI плазмиды pBT-hEGF клонировали по сайту рестриктазы SalI в эту же плазмиду (см. рис. 2), затем тот же фрагмент XhoI-SalI аналогично — в плазмиду pBT-(hEGF)<sub>2</sub> и т. д. В этих конструкциях с tac-промотора должны синтезироваться полицистронные мРНК, в которых каждый цистрон будет трансформироваться независимо.

Клетки *E. coli* JM105, трансформированные плазмидами этой серии, выращивали в тех же условиях, что и с плазмидой pBT-hEGF, выделяли периплазматические фракции и исследовали их с помощью иммуоферментного анализа. Результаты, представленные в табл. 1, показывают, что при дупликации рекомбинантного гена количество hEGF в периплазме возрастает и остается на том же уровне при 3 и 4 копиях гена, причем этот уровень несколько ниже наблюдаемого в JM105/pBTN-hEGF. Увеличение числа копий гена, однако, приводит к повышению экскреции hEGF в культуральную среду. Количество белка, остающееся внутри клеток, не оценивалось.

Штамм JM105/pBT-(hEGF)<sub>2</sub> был использован для препаративного выделения hEGF.

Препарат периплазматической фракции разбавляли в 2 раза водой и доводили pH раствора до 3,0. При инкубации раствора (30 мин) наблюдалось осаждение значительной части примесных белков, которые отделяли центрифугированием (рис. 4, дорожка 3). Супернатант хроматографировали с помощью ОФ гидрофобной хроматографии на колонке с

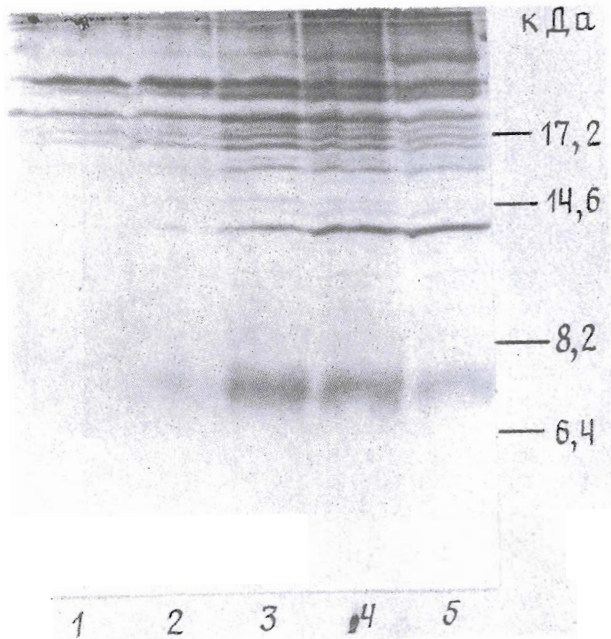


Рис. 3. Электрофореграммы периплазматической фракции белков в 15% SDS ПААГ. 1 - штамм JM105/pKKD; 2 - JM105/pBT-hEGF; 3 - JM105/pBT-(hEGF)<sub>2</sub>; 4 - JM105/pBT-(hEGF)<sub>3</sub>; 5 - JM105/pBT-(hEGF)<sub>4</sub>. В качестве стандарта использовали набор белков-стандартов для электрофореза (Pharmacia)

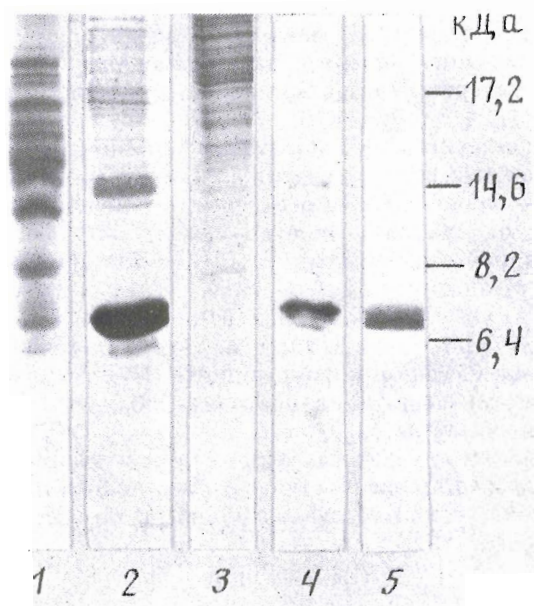


Рис. 4. Электрофорез препаратов hEGF на различных стадиях очистки: 1 - клеточный лизат; 2 - периплазматическая фракция; 3 - осадок после инкубации при pH 3,0; 4 - элюат с Davisil C<sub>18</sub>; 5 - элюат с μBondapak C<sub>18</sub>

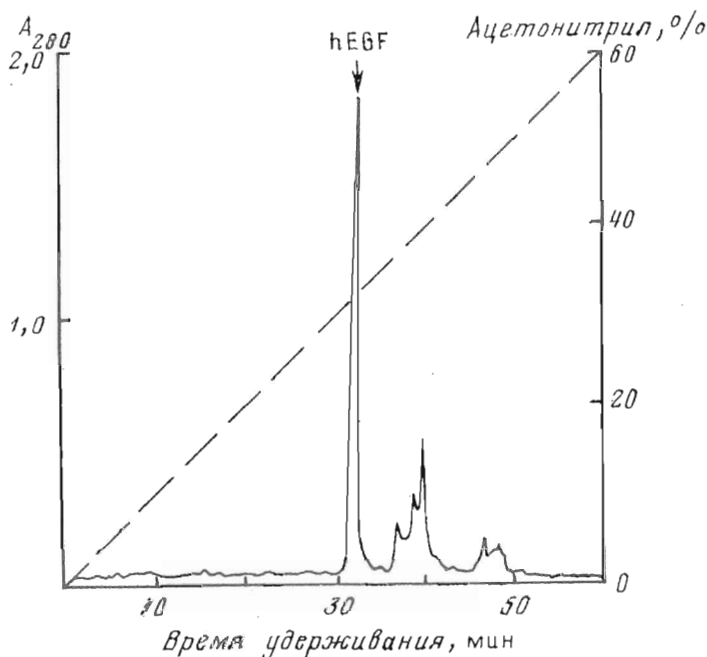


Рис. 5. Разделение hEGF на колонке с  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub>. Скорость потока 4 мл/мин

Davisil C<sub>18</sub>. После нанесения препарата большая часть примесей удалялась с колонки при промывке 30% метанолом, содержащим 0,1% TFA. Элюцию hEGF проводили 50% раствором метанола, содержащим 0,1% TFA. На данной стадии достигалась высокая степень очистки hEGF (табл. 2), элюат содержал лишь минорные примеси балластных белков (рис. 4, дорожка 4).

Для дальнейшей очистки препарат лиофилизировали и растворяли в 0,1% TFA. Полученный раствор содержал значительную часть примесных денатурированных белков, которые отделяли центрифугированием.

Заключительную стадию очистки hEGF проводили, используя ОФ-ВЭЖХ на колонке с  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub>. hEGF элюировали с колонки линейным градиентом ацетонитрила (0–60%) в 0,1% TFA (рис. 5). Полученный препарат hEGF лиофилизировали и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Результаты очистки hEGF приведены в табл. 2. Белок получен из периплазмы *E. coli* в состоянии, близком к гомогенному (>98%), с выходом 70%. Представленный метод выделения позволяет получить до 7 мг hEGF из 1 л бактериальной культуры.

По данным SDS-электрофореза, молекулярная масса hEGF составляет 7 кДа. Результаты 25 циклов N-концевого аминокислотного секвенирования согласуются с известной последовательностью hEGF.

Очистка hEGF

Таблица 2

Стадии очистки	Общий белок, мг	Общий объем, мл	hEGF, мг	Чистота, %	Выход, %
Периплазма	100	100	10	10	100
Сувернатант (pH 3,0)	80	200	9	11,3	90
Davisil C <sub>18</sub>	10	16	7,5	75	75
$\mu$ Bondapak C <sub>18</sub>	7	10	7	98	70



Рекомбинантный hEGF обладал выраженной биологической активностью в тесте на раскрытие глаз новорожденных мышей. Животные открыли глаза: неинъецированные — на 14-е сут, с инъекциями мышечного mEGF — на 8–9-е сут, с инъекциями hEGF — на 10-е сут, что совпадает с литературными данными для природного человеческого EGF [7].

### Экспериментальная часть

В работе использовали трис, EDTA, акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, персульфат аммония, TEMED, ампициллин (Serva), агарозу, АТФ, бромистый этидий, IPTG (Sigma), мочевицу, неорганические соли для среды М9 квалификации ос.ч. или х.ч. (Союзреактив), агар, триптон, дрожжевой экстракт, казаминокислоты (Difco), Davisil (Cheminst).

Ферменты: Т4-полинуклеотидкиназа, Т4-ДНК-лигаза (ИПО «Фермент», Вильнюс), рестрикционные эндонуклеазы *EcoRI*, *PstI*, *Sau3A*, *HindIII*, *BamHI*, *SalI*, МВ-нуклеаза и ДНК-полимераза I (фрагмент Клевова) производства PL Biochemicals. Поликлональные кроличьи антитела к hEGF, биотинилированный hEGF и конъюгат стрептавидин-пероксидаза хрена предоставили Э. Н. Цыциковым (ВНИИ биотехнология).

Олигонуклеотиды (5'→3'): GTTGGCCATCTTTGTTATAGATTTCTGC (I), GAATTCGGGAATTC (II), AATTGCTCGAGCTGCA (III), GCTCGAGC (IV), GCAGAAATCTATAACAAA (V), GATGGCAACAAAGTAGATCTGAAAAAG (VI), AATTCTTTTTCAGATCTACTTT (VII) — были синтезированы как описано в работе [8].

Фосфорилирование олигонуклеотидов, выделение фрагментов ДНК из агарозных и полиакриламидных гелей, достраивание «липких» концов во фрагментах ДНК, обработку растворов смесью фенол — хлороформ, осаждение ДНК этиловым спиртом, лигирование, выделение ДНК рекомбинантных клонов методом «быстрого лизиса» проводили как указано в руководстве [9].

Обработку ДНК рестриктазами, МВ-нуклеазой и ДНК-полимеразой I проводили в условиях, рекомендованных фирмами-производителями ферментов.

Получение реципиентных клеток и их трансформацию осуществляли по стандартной методике [10]. В качестве штамма-реципиента использовали *E. coli* JM105: Δ (*lac proAB*) *thi rpsL endA sbcB15 hsdR4* ( $r^{-}$   $m^{+}$ /F' *tra D36 proAB lacI<sup>c</sup> ΔM15* (Pharmacia).

Клетки *E. coli* выращивали в синтетической среде М9 [9] с добавлением тиамина до 0,0005% и ампициллина до 20 мг/л. Трансформанты отбирали на среде М9, содержащей 1,5% агара, 0,0005% тиамина и 50 мг/л ампициллина.

ДНК секвенировали по Максаму — Гилберту [11].

Периплазматическую фракцию клеточных белков выделяли как описано в работе [12].

Количественное содержание hEGF в периплазматической фракции определяли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) [13].

Определение аминокислотной последовательности hEGF проводили на газофазном секвенаторе фирмы Applied Biosystems (USA) модели 477A, снабженном автоматическим анализатором фенилтиогидантоионов аминокислот (модель 120A той же фирмы). Сухой образец растворяли в 25% TFA, наносили аликваты (3×30 мкл, суммарно 100–300 пмоль белка) на фильтр реактора и высушивали каждую промежуточную аликвоту на фильтре в токе инертного газа. После проведения 25 циклов отщепления идентифицировали природу аминокислот.

Биологическую активность определяли, используя тест на индукцию ускоренного раскрытия глаз при введении новорожденным мышам



hEGF [14]. Новорожденных мышей линии C57BL/6 инфицировали раствором hEGF в течение первых пяти дней жизни (2 мкг/г веса). В качестве контроля параллельно наблюдали группу неинфицированных мышей (отрицательный контроль) и группу мышей, инфицированных природным мышинным mEGF (положительный контроль). Фиксировали сроки раскрытия глаз в опыте и контроле.

*PstI-PstI-фрагмент гена OmpF* выделяли с учетом известной рестрикционной карты гена *OmpF* [15]. 150 мкг бактериальной геномной ДНК штамма *E. coli* C600, полученной по методике [16], обрабатывали рестриктазами *SalI* и *PvuII*, зону фрагментов длиной 3,5–4,0 т. п. о. выделяли из 0,7% агарозного геля. Полученную ДНК обрабатывали рестриктазами *BamHI* и *HindIII* (их сайты отсутствуют в гене *OmpF*) и из агарозного геля выделяли ту же зону. Далее ДНК обрабатывали рестриктазами *EcoRI* и *BglII*, зону фрагментов длиной 1,0–1,5 т. п. о. выделяли из 0,9% агарозного геля и клонировали по сайтам указанных рестриктаз в плазмиде pUC18. Клоны, содержащие начало гена *OmpF*, выявляли гибридизацией с радиоактивно-меченым олигодезоксирибонуклеотидом (I) как описано в статье [8]. ДНК одного из полученных клонов обрабатывали рестриктазой *PstI*, фрагмент длиной 180 п. о. выделяли из 8% ПААГ и переклонировали в pUC18 по сайту *PstI*. Нуклеотидная последовательность вставки, определенная методом Сэнгера с модификациями для плазмиды [17], полностью соответствует последовательности соответствующей области *ompF* [18].

*Замена дистального PstI-PstI (по ходу трансляции) сайта PstI* (см. рис. 1). При гидролизе фрагмента *PstI-PstI* длиной 180 п. о. рестриктазой *Sau3A* образуются 2 фрагмента — 140 и 40 п. о. Последний клонировали по сайтам *PstI* и *BamHI* в векторе pUC18delRI, который отличается от pUC18 отсутствием сайта рестриктазы *EcoRI* и получен нами путем достройки «лишних» *EcoRI*-концов фрагментом Кленова в присутствии dATP и dTTP (0,5 мМ каждый) с последующим лигированием по «ступям» концам. 1 мкг полученной плазмиды pUC18delRI-*Sau3A/PstI* «40», вставка которой кодирует конец лидерного пептида *OmpF*, обрабатывался рестриктазой *PstI*, затем фрагментом Кленова в отсутствие дезоксирибонуклеотидтрифосфатов. Самокомплементарный олигодезоксирибонуклеотид (II) (0,25 мкг) фосфорилировали по 5'-концу с помощью T4-полинуклеотидкилазы и gATP, отжигали (понижение температуры от 65 до 20° С в течение 2 ч) и лигировали с полученной ДНК. Лигазную смесь выдерживали при 70° С 15 мин, обрабатывали рестриктазой *EcoRI* (50 ед. акт., 4 ч) для высвобождения короткого участка синтетического олигонуклеотида между двумя сайтами этой рестриктазы и высокомолекулярную ДНК осаждали 0,1% цетилтриметиламмонийбромидом. Далее проводили лигирование (0,1 мкг ДНК в 50 мкл) и трансформацию реципиентных клеток штамма JM105. Плазмиды, выделенные из ампициллин-устойчивых клонов, проверяли на наличие сайта рестриктазы *EcoRI* и секвенировали по методу Максэма — Гилберта. Полученную таким образом плазмиду pUC18delRI-*Sau3A/EcoRI* «40» гидролизали рестриктазами *Sau3A* и *EcoRI* и фрагмент длиной 40 п. о. выделяли из 12% ПААГ. Далее лигировали выделенные фрагменты (140 и 40 п. о.) с вектором pUC18/*EcoRI/PstI* и полученной плазмидой трансформировали реципиентные клетки JM105. Структуру полученной плазмиды pUC18-*OmpF(PstI/EcoRI)* подтверждали рестрикционным анализом и секвенированием области, включающей *ompF*, методом Сэнгера.

*Конструирование плазмиды pKKD*. ДНК коммерческой плазмиды pKK223-3 обрабатывали рестриктазами *EcoRI* и *PstI* и векторный фрагмент выделяли из 0,9% агарозного геля. Олигодезоксирибонуклеотиды (III) и (IV) отжигали в эквимоллярных количествах (от 60 до 20° С в

течение 2 ч) и лигировали с вектором в молярном соотношении 50:1. После трансформации реципиентных клеток JM105 была получена плазмида рКК-*XhoI*. ДНК этой плазмиды обрабатывали рестриктазой *BamHI*, «липкие» концы достраивали с помощью фрагмента Кленова и смеси четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов и лигировали ДНК по «тупым концам». Далее проводили трансформацию клеток JM105 и отбор плазмид, не содержащих сайта *BamHI*. Элиминацию сайта рестриктазы *SalI* в полученной плазмиде проводили аналогично. Схема образовавшейся плазмиды рККD приведена на рис. 2.

**Конструирование плазмиды рBT-hEGF** (см. рис. 2). ДНК плазмиды рUC18-*OmpF* (*PstI/EcoRI*) обрабатывали рестриктазами *PstI* и *EcoRI*, ДНК плазмиды рUC18-hEGF — рестриктазами *EcoRI* и *HindIII*. Фрагменты, содержащие гены *ompF* и *hegf* (оба примерно 180 п. о.) выделяли из 8% ПААГ. ДНК плазмиды рККD обрабатывали рестриктазами *PstI* и *HindIII* и векторный фрагмент выделяли из 0,9% агарозного геля. Выделенные фрагменты лигировали в эквимольном соотношении. Лигазной смесью трансформировали реципиентные клетки JM105. Структуру полученной плазмиды рBT-hEGF подтверждали рестрикционным анализом и секвенированием гибридного гена методом Сэнгера.

**Конструирование плазмиды рVTN-hEGF** (см. рис. 2). ДНК плазмиды рBT-hEGF обрабатывали рестриктазами *EcoRI* и *HindIII* и фрагмент, несущий ген *hegf*, выделяли из 8% ПААГ. Олигодезоксирибонуклеотиды (I), (V) — (VII) (по 5 пмоль) фосфорилировали по 5'-концам с помощью T4-полинуклеотидкиназы и гАТФ и отжигали при температуре от 80 до 20°С в течение 4 ч. В смесь добавляли 1,5 пмоль фрагмента *EcoRI-HindIII*, 1/10 объема 10-кратного лигазного буфера, 2 ед. акт. T4-ДНК-лигазы и лигировали 2 ч при 14°С. Раствор обрабатывали смесью фенол — хлороформ (1:1) и ДНК осаждали спиртом. Далее ДНК расщепляли рестриктазой *HindIII* и выделяли из 8% ПААГ фрагмент, содержащий последовательность 12 кодонов N-концевой части зрелого *ompF*, кодонов дипептида -LysLys- и гена *hegf* (230 п. о.). ДНК плазмиды рBT-hEGF обрабатывали рестриктазой *EcoRI* и «липкие концы» удаляли МВ-нуклеазой. После обработки смесью фенол — хлороформ (1:1) ДНК расщепляли рестриктазой *HindIII* и векторный фрагмент выделяли из агарозного геля. Затем полученную ДНК лигировали с фрагментом (230 п. о.) в соотношении 3:1. Клоны, несущие синтетический фрагмент, выявляли гибридацией с радиоактивно-меченым олигонуклеотидом (I) как описано в работе [8]. Плазмиду с правильной структурой отбирали после секвенирования методом Максама — Гилберта.

**Конструирование серии плазмид рVT-(hEGF)<sub>n</sub>** (см. рис. 2). ДНК плазмиды рBT-hEGF обрабатывали рестриктазами *SalI* и *XhoI* и фрагмент гибридного гена (360 п. о.) выделяли из 1,5% агарозного геля. Выделенный фрагмент лигировали с плазмидой рVT-hEGF, обработанной рестриктазой *SalI*. Правильность ориентации фрагмента *SalI-XhoI* в плазмиде рVT-(hEGF)<sub>2</sub> определяли после гидролиза рестриктазами *SalI* и *XhoI* по размеру образующегося фрагмента. Плазмиды с 3 и 4 копиями гена *hegf* получены аналогично.

**Выделение hEGF.** Периплазматическую фракцию получали как описано в работе [12]. Из 1 л бактериальной культуры было получено 100 мл препарата в буфере, содержащем 1 М трис-НСl, рН 9,0; 2 мМ EDTA. Для очистки hEGF препарат периплазматической фракции разбавляли в два раза водой при перемешивании и доводили рН до 3,0 2 н. НСl. После 30 мин инкубации и центрифугирования (12 000g, 30 мин) супернатант наносили на колонку (5×2 см) с Davisil C<sub>18</sub> (90—130 мкм), уравновешенную 10% метанолом (1 объем). Колонку последовательно промывали 10% метанолом (1 объем) и 30% метанолом (2 объема), содержащим

0,1% TFA. hEGF элюировали 3 объемами 50% метанола, содержащего 0,1% TFA, при скорости потока 4 мл/мин. Элюат лиофилизировали с помощью Speed-Vac (Savant) и проводили заключительную стадию очистки с помощью ОФ-ВЭЖХ. Препарат растворяли в 0,1% TFA и наносили на колонку и Вондорак C<sub>18</sub> (0,78×30 см) фирмы Waters. hEGF элюировали с помощью линейного градиента концентрации ацетонитрила (20–60%) в 0,1% TFA. На всех стадиях очистки тестирование hEGF осуществляли с помощью SDS-электрофореза и иммуноферментного анализа.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Medical World News, 1986, V. 13, № 10, P. 17, P. 3589–3593.
2. Барчикова Н. В., Скапцова Н. В., Твардовская С. Е., Бесидский Е. С., Данилова Ю. В., Степанов А. П., Ажаев А. В. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14, № 5, С. 621–630.
3. Matsuyama S.-I., Mizuno T., Mizushima S. // J. Bacteriol. 1986. V. 168, № 3, P. 1309–1314.
4. Ostrow K. S., Silhavy T. J., Garrett S. // J. Bacteriol. 1986. V. 168, № 3, P. 1165–1171.
5. Heyde M., Portatier R. // Mol. Gen. Genet. 1987. V. 208, № 3, P. 511–517.
6. Luokkamaki M., Palva E. T. // FEMS Microbiol. Lett. 1987. V. 40, № 1, P. 21–25.
7. Ohgai H., Kumakura T., Komoto S., Matsuo Y., Ohshiden K., Koide T., Yanaihara C., Yanaihara N. // J. Biotechnol. 1989. V. 10, № 2, P. 151–160.
8. Кулагина М. А., Скапцова Н. В., Барчикова Н. В., Куркин А. Н., Ажаев А. В. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16, № 5, С. 625–634.
9. Maniatis T., Fritsch E. E., Sambrook J. // Molecular Cloning, A Laboratory Manual, CSH Lab. 1982.
10. Cohen C. N., Chang A. C. Y., Hsu L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. V. 69, № 8, P. 2110–2114.
11. Mazam A. M., Gilbert W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74, № 2, P. 560–564.
12. Engler D. A., Matsunami R. K., Campion S. R., Stringer C. D., Stevens A., Niyogi S. K. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263, № 25, P. 12384–12390.
13. Bosh A. M. G., Van Hell H., Brands Y., Schuurs A. H. W. M. // Enzyme Labeled Immunoassay of Hormones and Drugs / Ed. S. B. Pal. B.: Water de Gruyter, 1979. P. 175–187.
14. Allen G., Winther M. D., Henwood G. H., Beesley J., Sharry L. F., O'Keefe J., Bennett J. W., Chapman R. E., Hollish D. E., Panaretto B. A., Van Dooren P., Edols R. W., Inglis A. S., Wynn P. C., Moore G. P. M. // J. Biotechnol. 1987. V. 5, № 2, P. 93–114.
15. Mutoh N. // FEBS Lett. 1982. V. 137, № 2, P. 171–174.
16. Pitcher J., Sounder K. // Lett. Appl. Microbiol. 1989. V. 8, № 4, P. 151–156.
17. Краев А. С. // Молекуляр. биология. 1988. Т. 22, № 5, С. 1164–1197.
18. Inokushi K., Mutoh N., Matsuyama S., Mizushima S. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10, № 21, P. 6957–6968.

Поступила в редакцию  
19.IX.1991

После доработки  
27.I.1992

N. V. BATCHIKOVA, I. B. ALTMAN, S. V. LUTSENKO, V. A. SMIRNOV,  
I. V. NAZIMOV\*, L. G. ESHKIND, E. A. SINYAGINA, A. V. AZHAYEV

#### SECRETION OF RECOMBINANT HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR INTO PERIPLASM OF *E. COLI* CELLS

«Chimtech» Ltd, Moscow;

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

Secretion vectors were constructed in which a synthetic gene of human epidermal growth factor (hEGF) joined with a gene coding for the leader peptide to one of the *E. coli* outer membrane major proteins (OmpF) is controlled by *tac* promoter. The increase of the hEGF yield was achieved by the multiplication of the gene copies. The hEGF in bacterial cells was secreted into periplasm. The recombinant protein was isolated by means of reverse phase chromatography as almost homogenous preparation (>98%), the yield being 7 mg/l bacterial culture. The sequence of twenty-five N-terminal amino acid residues of the isolated hEGF coincided with that of the natural protein. The preparation proved to be biologically active.