



УДК 577.112 : 577.113.66.088 : 547.963.32.057

© 1993 С. К. Карпова, Е. Т. Сазина,
В. С. Карасев, Л. Б. Бадер*, О. В. Сергиенко*,
А. А. Шишкина, Ю. П. Швачкин, В. Г. Лукин*,
Т. И. Тухоненко*, Ю. А. Панков

СИНТЕЗ СОМАТОСТАТИНА В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*. ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА

Институт экспериментальной эндокринологии ЭНЦ РАМН, Москва;
* Научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии РАСХН, Москва

Синтетический ген соматостатина (*sst*) клонировали в единой трансляционной рамке с геном хлорамфеникол—ацетилтрансферазы (*cat*) так, что части слитого белка были соединены через остаток Met. Гибридный ген *cat-sst* экспрессировался под контролем собственного промотора гена *cat* или промотора триптофанового оперона. Накопление гибридного белка CAT—SST (в тельцах включения) составляло 5% общего белка клетки в условиях конститутивного синтеза и 30% в условиях индуцируемого синтеза. Гибридный белок расщепляли бромцианом и соматостатин выделяли с использованием гель-фильтрации и обращенно-фазовой хроматографии. Очищенный до индивидуального состояния и ренатурированный SST обладает специфической биологической и иммунологической активностями природного соматостатина.

Соматостатин (SST) — биологически активный тетрадекапептид, основными продуцентами которого являются гипоталамус и D-клетки поджелудочной железы и желудочно-кишечного тракта. Впервые выделенный из гипоталамусов овец в 1973 г. [1] соматостатин проявляет сильное ингибирующее действие на секрецию ряда гормонов, в том числе соматотропина, тиротропина, глюкагона, а также на экзокринную функцию поджелудочной железы и желудка. Полифункциональность действия SST открывает широкие перспективы использования его для лечения различных эндокринных заболеваний, связанных с повышенной секрецией гормонов (акромегалия и др.), а также ряда болезней желудочно-кишечного тракта (острые кровотечения, язвы, торможение послеоперационных фистул поджелудочной железы и др.). Несомненный интерес представляет аутоиммунная реакция на SST как способ индукции анаболических процессов, приводящих к ускоренному росту сельскохозяйственных животных [2, 3].

Пионерская работа Итакуры [4] в 1977 г. по экспрессии синтетического гена *sst* в клетках *E. coli* положила начало зарубежным исследованиям по получению этого пептида микробиологическим способом [5—8].

Сокращения: SST — соматостатин-14; CAT — хлорамфеникол—ацетилтрансфераза; TFA — трифторуксусная кислота; ОФ ВЭЖХ — обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; СТГ — соматотропный гормон.

a

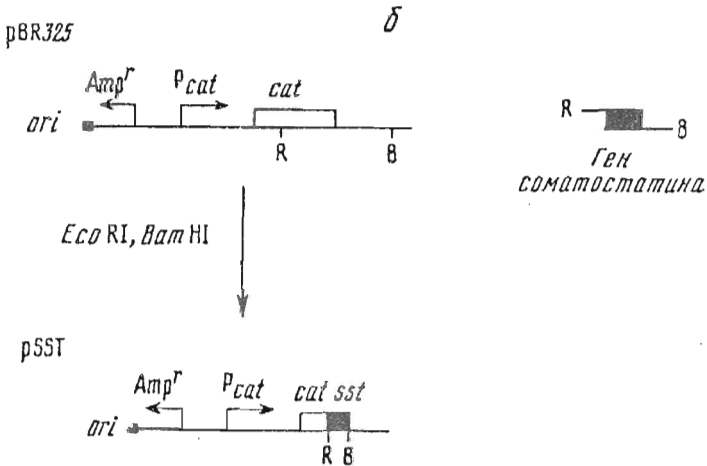
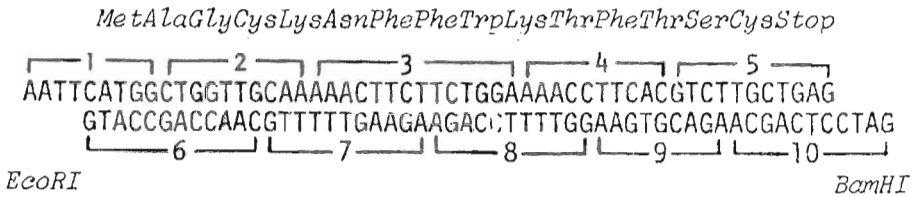


Рис. 1. Схема клонирования синтетического гена соматостатина. Условные обозначения: *cat* и *sst* — гены хлорамфеникол—ацетилтрансферазы и соматостатина, *P_{cat}* — промотор гена *cat*, *Amp^r* — ген устойчивости к ампициллину, *ori* — начало репликации плазмиды. Указано положение сайтов рестриктаз (R — *EcoRI*, B — *BamHI*). a — структура синтетического гена *sst*; цифрами обозначены номера олигонуклеотидных блоков, б — схема клонирования гена *sst*

Ранее мы сообщали о синтезе гена соматостатина-14 [9]. Нуклеотидная последовательность синтетического гена и концевых областей представлены на рис. 1а. С целью получения препарата соматостатина для проведения медико-биологических исследований нами разработаны генно-инженерные подходы по созданию его бактериального продукта. Установлено, что SST нестабилен в клетках *E. coli* [4]. В связи с этим нами была создана система для получения SST в виде гибридного белка. При этом учитывалась возможность последующего выщепления целевого продукта из состава синтезируемого гибридного белка. Были сконструированы экспрессионные плазмидные векторы, в которых ген *sst* соединялся с 3'-концом гена *cat* через кодон метионина. В созданных плаزمидях в качестве регуляторных элементов транскрипции использовались различные промоторы, в частности собственный промотор гена *cat* и промотор триптофанового оперона.

Клонирование синтетического гена *sst* осуществляли в плазмидный вектор pBR325 по сайтам рестриктаз *EcoRI* и *BamHI* (рис. 1). В клонах, имеющих фенотип *Amp^rCm^rTc^s*, с помощью рестрикционного анализа определяли наличие вставки, содержащей ген *sst*. Первичная структура вставки подтвердила ее соответствие последовательности гена *sst*. Полученная таким образом плаزمида pSST была использована в качестве источника гена *sst* при конструировании экспрессионных векторов.

Для удобства подстройки синтетического гена *sst* к гену *cat* из центральной части гена *cat* удаляли сайт рестриктазы *EcoRI* путем лигирования 5'-выступающих концов, образовавшихся при расщеплении ДНК рестриктазой *EcoRI*, с синтетическим дуплексом А (рис. 2). Полученный при этом модифицированный

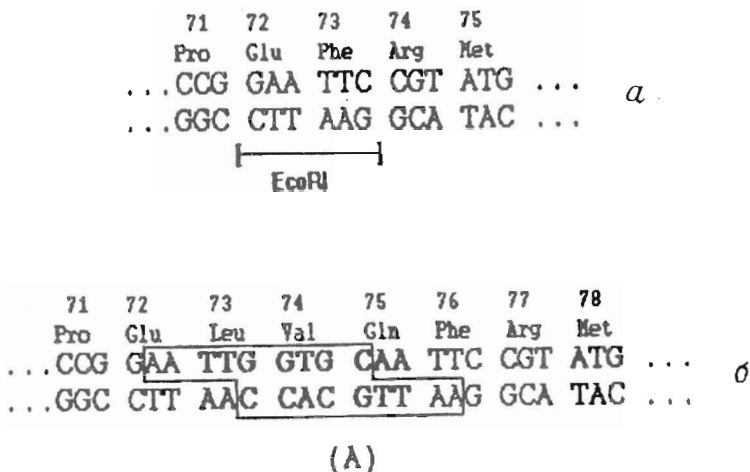


Рис. 2. Фрагменты нуклеотидных последовательностей гена *cat* в области *EcoRI*-сайта: *a* — природная структура гена *cat*; *b* — после введения синтетического дуплекса А (заключен в рамку) по сайту рестриктазы *EcoRI*. Три дополнительных к природной структуре кодона выделены жирным шрифтом

ген *cat* отличается от природного наличием трех дополнительных кодонов (73—75), не меняющих рамку трансляции этого гена.

На заключительном этапе конструирования 3'-концевой фрагмент гена *cat* (26 п.о.) был замещен на синтетический ген *sst* путем расщепления гена *cat* рестриктазой *ScaI*. В полученной плазмиде рССSt единая фаза трансляции гибридного гена *cat-sst* сохранялась при помощи адаптера В (рис. 3).

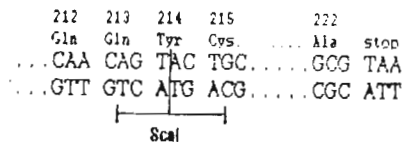
Транскрипция гибридного гена в плазмиде рССSt осуществлялась под контролем конститутивного промотора гена *cat* и двух терминаторов фага fd.

Для выявления экспрессии гибридного гена плазмиду рССSt ввели в клетки *E. coli* MKD3207 со сниженным уровнем деградации аномальных белков [10], поскольку первоначально в штамме HB101 продукция целевого белка не была обнаружена. Полученные трансформанты, устойчивые к ампициллину, анализировали на наличие экспрессии с помощью электрофореза в градиентном 10—20% SDS-ПААГ (рис. 4). Присутствие доминирующей полосы в области молекулярной массы 24 кД свидетельствует о наличии гибридного белка CAT-SST. Уровень экспрессии гибридного белка составил 5% суммы белков бактериальной клетки (рис. 4, 2). Для увеличения уровня экспрессии промотор P_{cat} в конструкции рССSt был заменен на промотор триптофанового оперона из векторной плазмиды рDR720 [11]. Схема конструирования плазмиды рТССSt приведена на рис. 5. После индукции транскрипции с клонированного промотора триптофанового оперона β -индолилукриловой кислотой уровень экспрессии гибридного белка в клетках *E. coli* MKD3207, трансформированных плазмидой рТССSt, составил 30% общих белков клетки (рис. 4, 3).

Таким образом, нами были сконструированы экспрессирующие векторные системы, обеспечивающие конститутивный или индуцируемый синтез гибридных белков CAT-SST на уровне 5—30% суммарных клеточных белков в штаммах *E. coli* со сниженной активностью протеиназ. Полученные результаты соответствуют лучшим показателям, достигнутым другими авторами, которые под контролем различных прокариотических промоторов (P_{lac} , P_{trp} , P_{tacA}) получали экспрессию гена *sst* в виде гибридных белков, используя в качестве белков-носителей β -галактозидазу [4], полипептид RecA [6], белок LH [8], белки TrpE и TrpD [7, 5].

В дальнейшей работе по выделению рекомбинантного SST из бактериальной массы мы использовали штаммы-продуценты с конститутивным синтезом целевого

а



б

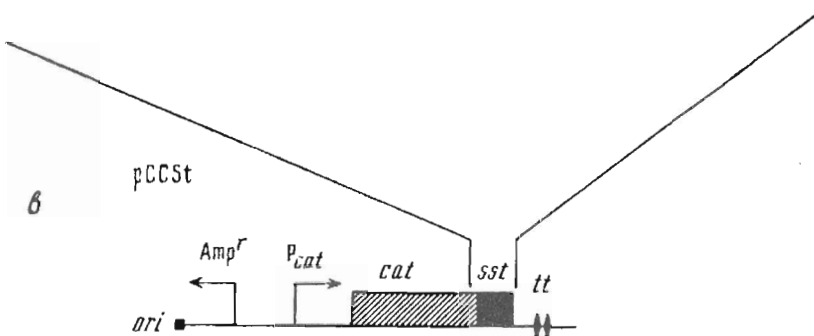
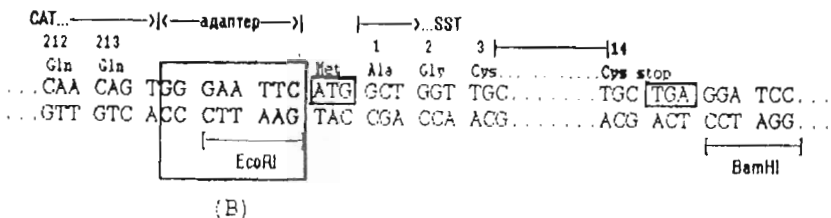


Рис. 3. Заключительный этап конструирования плазмиды pCCSt. Фрагменты нуклеотидных последовательностей, кодирующих С-концевые участки; а — модифицированного CAT; б — гибридного белка CAT-SST. (B) — нуклеотидная последовательность адаптера В. в — схема плазмидного вектора pCCSt. tt — терминаторы транскрипции фара fd

белка, поскольку химический индуктор, β-индолилукриловая кислота, был доступен нам в ограниченных количествах, не позволяющих производить наращивание бактериальной культуры в объемах ферментера.

При экстрагировании гибридного белка CAT-SST из бактериальных клеток было обнаружено, что он присутствует в тельцах включения, нерастворимых в водных растворах со слабыми детергентами (третон X-100). Анализ литературных данных показал распространенность данного феномена при экспрессии чужеродных белков в клетках *E. coli* [12]. Благодаря этому свойству уже на первой стадии выделения удалось получить препарат гибридного белка с чистотой 70–80% по данным электрофореза в SDS-ПААГ (рис. 4, 4, 5). Суть первого этапа выделения заключалась в сочетании ультразвуковой обработки клеток и центрифугирования с поочередной 4-кратной промывкой содержащего гибридный белок осадка раствором третон X-100 и EDTA.

SST выселяли из гибридного белка, обрабатывая его бромцианом благодаря наличию остатка Met перед N-концевой аминокислотой SST. Для увеличения эффективности химического расщепления агрегировавший гибридный белок солюбилизировали в 6 M гуанидингидрохлориде с последующим восстановлением внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей, хаотично образующихся в тельцах включения в результате автоокисления SH-групп в процессе разрушения клеток. Полученный раствор диализовали, образовавшийся осадок гибридного

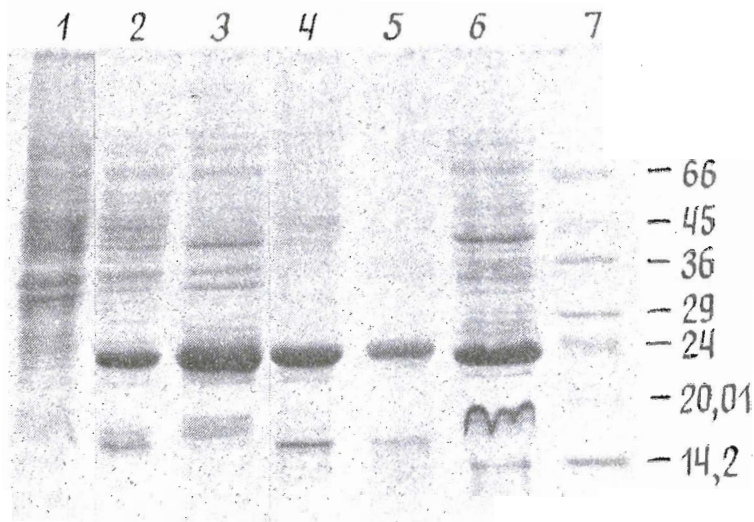


Рис. 4. Электрофорез в ПААГ суммарных клеточных белков штамма *E. coli* MKD3207 (1), несущего плазмиды с геном *ssf*, *pCCSt* (2) и *pTCCSt* (3) и гибридных белков, выделенных из этих штаммов: CAT-SST/*pCCSt* (4), CAT-SST/*pTCCSt* (5); 6 — pCAT в *E. coli* HB101 (контроль); 7 — маркеры молекулярных масс (кДа)

белка отделяли центрифугированием и подвергали расщеплению бромцианом. Качество гидролиза контролировали с помощью электрофореза в 10—20% SDS-ПААГ по исчезновению исходной полосы гибридного белка.

Исходя из известной структуры CAT [13] в случае гидролиза гибридного белка по всем остаткам метионина можно ожидать образования 10 фрагментов, причем в 5 из них присутствуют остатки цистеина. Во избежание образования аномальных дисульфидных связей между фрагментами бромцианового гидролизата следующую стадию очистки — гель-фильтрацию бромцианового гидролизата — проводили в восстанавливающих условиях. Идентификацию SST в элюированных фракциях осуществляли с помощью радиоиммунологического анализа после их предварительного обессоливания. В результате получена фракция, обогащенная иммунореактивным соматостатином.

Заключительную стадию очистки SST проводили с использованием ОФ ВЭЖХ. Из обогащенной соматостатином фракции элюцией в градиенте ацетонитрила были получены три пика, незначительно различающихся по времени удерживания на обращенной фазе, пептидный материал которых имел идентичный аминокислотный состав и N-концевую аминокислоту, соответствующие SST (рис. 6). Пептидный материал из пика 2 имел то же время удерживания на колонке, что и нативная форма SST. Восстановление лиофилизированного пула из трех пиков привело к исчезновению пика 2, сохранив неизменным время удерживания материала из пика 1. Таким образом были получены фракции SST, одна из которых (пик 2) содержит циклическую форму SST, самопроизвольно образующуюся в процессе выделения, вторая (пик 3) — его восстановленную форму, а третья (пик 1), по-видимому, является изоформой SST, которая может возникать в результате окисления сульфгидрильных групп остатков цистеина перекисными соединениями в ходе гидролиза бромцианом.

Ренатурацию молекулы рекомбинантного SST, сопровождающуюся образованием одной дисульфидной связи $Cys^3 - Cys^{14}$, проводили путем окисления кислородом воздуха фракции восстановленного SST по методу Ривьера [14] с некоторыми модификациями. В этой реакции концентрация SST не должна

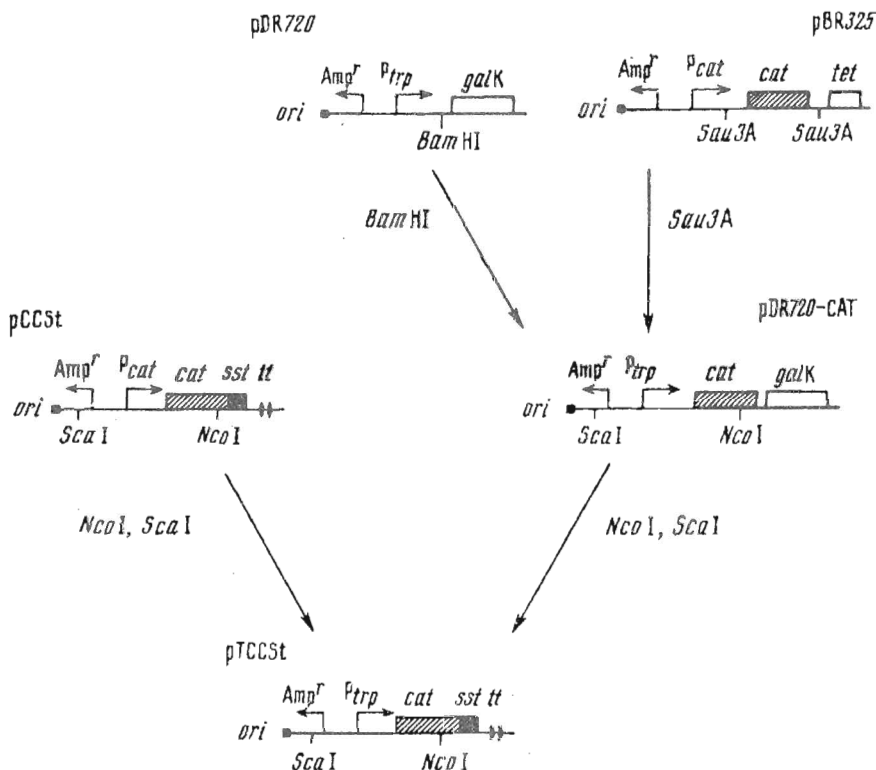


Рис. 5. Схема конструирования плазмиды pTCCSt. Условные обозначения: P_{trp} — промотор триптофанового оперона, galK — ген галактозы. Указано положение сайтов рестриктаз. Прочие условные обозначения указаны в подписях к рис. 1, 2

превышать 100 мкг/мл для предотвращения формирования межмолекулярных дисульфидных связей. Динамику процесса ренатурации контролировали ОФ ВЭЖХ, используя в качестве контроля как циклический, так и восстановленный для этой цели коммерческий препарат SST.

После дополнительной очистки ренатурированного SST на ОФ ВЭЖХ (рис. 7) чистоту полученных препаратов подтверждали ОФ ВЭЖХ, электрофорезом в 20% SDS-ПААГ и аминокислотным анализом.

Биологическую активность полученных препаратов рекомбинантного SST оценивали с помощью биотеста на первичных культурах клеток соматотропиномы человека. Продemonстрировано, что исследуемые препараты обладают высокой специфической активностью, проявляющейся в торможении продукции соматотропина клетками гипофиза и сравнимой с активностью стандартного препарата SST (таблица).

Результаты исследования биологической активности рекомбинантного соматостатина *

| Экспериментальные группы культур клеток аденомы гипофиза | Содержание СТГ в среде, нг/мл, $M \pm m$ | <i>p</i> |
|--|--|----------|
| Контроль (без SST) | 1482 ± 54 (4) | |
| Рекомбинантный SST (10 нг/мл) | 722 ± 60 (4) | < 0,001 |
| Стандарт SST (10 нг/мл) | 606 ± 32 (4) | < 0,001 |

* Статистический анализ проведен с использованием *t*-теста Стьюдента. $M \pm m$ — средняя величина ± стандартная ошибка. *P* — достоверность различия показателей у экспериментальной группы культуры клеток по отношению к контрольной группе. В скобках число использованных культур.

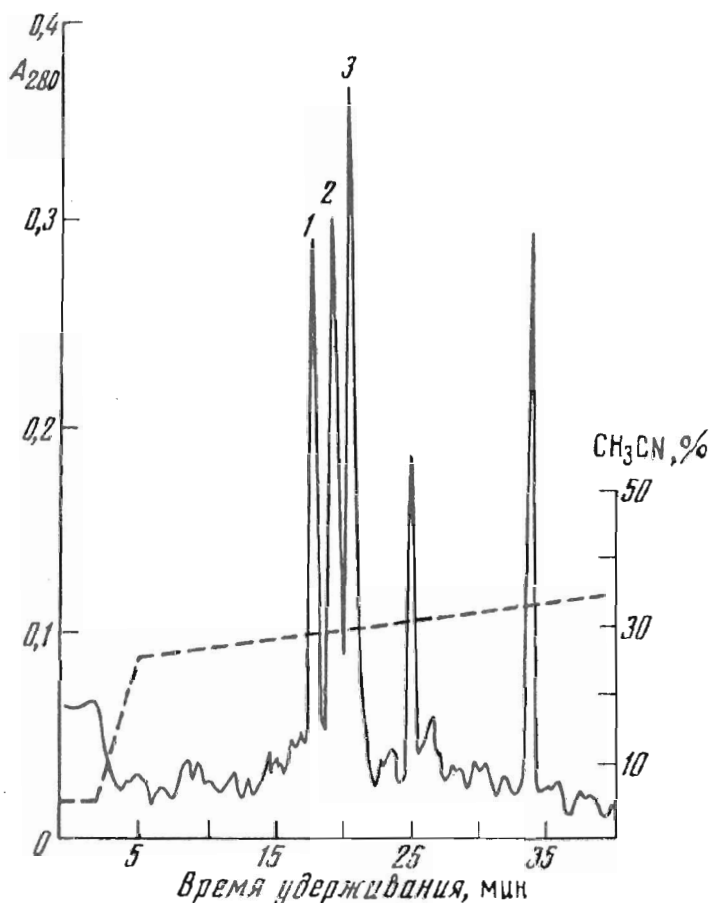


Рис. 6. УФ ВЭЖХ фракции, обогащенной SST, на колонке (10×150 мм) с носителем Диасорб 130 С₁₆, в градиенте концентрации ацетонитрила. 1, 2, 3 — соответственно модифицированная, циклическая (нативная) и восстановленная форма соматостатина. Штриховая линия — изменение концентрации ацетонитрила

При исследовании иммунологических свойств рекомбинантного SST с помощью коммерческих наборов фирмы Incstar (США), включающих в качестве стандарта и меченого компонента химически синтезированный SST, было показано, что характер взаимодействия с антителами синтетического и рекомбинантного SST не различается. Об этом свидетельствует одинаковый наклон кривых вытеснения меченого SST из комплекса с антителами (рис. 8).

Таким образом нами созданы бактериальные штаммы-продуценты SST и разработан способ выделения SST из бактериальной массы, позволяющий получать соматостатин 98% чистоты и с выходом приблизительно 1 мг/л. Полученный рекомбинантный соматостатин обладает такой же биологической и иммунологической активностями, как и химически синтезированный коммерческий препарат фирмы «Serva».

Экспериментальная часть

Использовали гуанидингидрохлорид, бромциан, 2-меркаптоэтанол, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, тритон X-100 (Merck), трис, персульфат аммония, муравьиную кислоту, CaCl₂, MgCl₂, стандарты молекулярных весов для электрофореза (Sigma), SDS, EDTA, диэтиотреит (Serva), TFA (Fluka), сефадекс G-50 (Pharmacia), мочевины (ос.ч., «Союзреактив» и Merck).

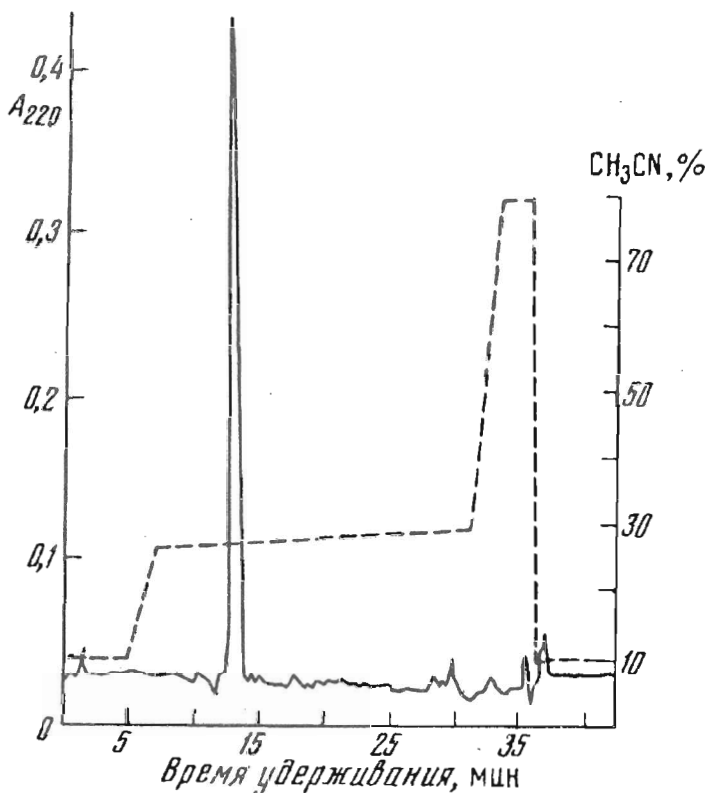


Рис. 7. ОФ ВЭЖХ очищенного препарата рекомбинантного SST на колонке (3×150 мм) с Nucleosil-1000pst, уравновешенной 0,1% ТФА, содержащей 10% ацетонитрил, в градиенте концентрации ацетонитрила. Скорость потока 0,6 мл/мин. Объем образца 100 мкл, количество вещества 20 мкг

В работе использовали ферменты *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *Sau3AI*, *PstI*, *BglII*, ДНК-лигазу фага T4 (НПО «Фермент», Вильнюс), *ScaI*, *SmaI* (Serva).

Ферментативные реакции проводили в условиях, рекомендованных фирмами-изготовителями.

В работе использовали штаммы *E. coli* K12 HB101 и MKD3207 (*F*⁻, *lac* Y, *sup E*, *gal* 6, *xyl* 4, *mal* A1, *arg* H, *his*['], *lon*⁻, *apr* 24, *pd*) [10].

Молекулярное клонирование, трансформацию и анализ плазмидных ДНК проводили по стандартным методикам [15, 16]. Нуклеотидные последовательности клонированных фрагментов определяли по методу Максама — Гилберта [17].

Синтез и фосфорилирование олигонуклеотидов выполняли по методу [18].

Электрофорез суммарных клеточных белков плазмидосодержащих штаммов *E. coli*, препаратов гибридного белка проводили по методу Леммли [19] с использованием 15% разделяющего и 5% концентрирующего гелей, а также линейного градиента акриламида 10—20%. В качестве маркеров молекулярной массы использовали наборы белковых стандартов фирмы Sigma. Денситометрию гелей осуществляли на денситометре Ultrosan (ЛКВ).

Концентрацию белка в растворах определяли по методу Лоури [20] с помощью коммерческих наборов фирмы Sigma.

Выделение гибридного белка CAT—SST. Использовали буферные растворы: А — 50 мМ трис-НСl (рН 8,0), 100 мМ NaCl, 1 мМ ЕДТА; Б — 1% тритон X-100, 50 мМ трис-НСl (рН 8,0), 10 мМ ЕДТА, 25 мМ NaCl; В — 0,2 М трис-НСl (рН 8,0), 6 М гуанидингидрохлорид, 2 мМ ЕДТА; Г — 0,1 М трис-НСl (рН 8,0),

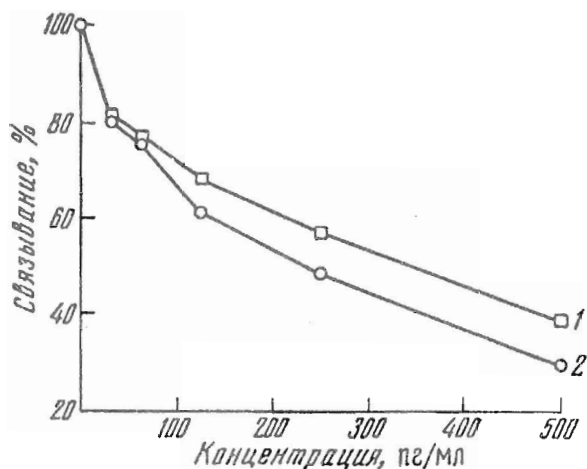


Рис. 8. Иммунореактивность рекомбинантного (1) и синтетического (2) SST в радиоиммунологической системе

8 М мочевины, 10% 2-меркаптоэтанол; Д — 0,02 М трис-НСI (рН 8,0), 6 М мочевины, 10 мМ 2-меркаптоэтанол.

Для выделения гибридного белка культуру клеток *E. coli*, содержащих рекомбинантные плазмиды, выращивали в течение 6—7 ч в среде LB [15] с добавлением 50 мкг/мл ампицилина при 37° С в 10-литровом ферментере до плотности оптического поглощения A_{550} 4,0—5,0. Клетки осаждали центрифугированием при 5000g в течение 10 мин. Сырую биомассу суспендировали в буфере А из расчета 10 мл на 1 г биомассы. После добавления лизоцима (конечная концентрация 0,2 мг/мл) суспензию инкубировали 15 мин при 25° С, охлаждали во льду и обрабатывали ультразвуком при 0° С. Лизат центрифугировали 5 мин при 12 000g. Полученный осадок, содержащий гибридный белок, ресуспендировали с помощью ультразвука в $1/2$ первоначального объема буфера Б и снова центрифугировали 5 мин при 12 000g. Процедуру повторяли трижды. Очищенный гибридный белок промывали буфером А и хранили при -35° С.

Гидролиз гибридного белка бромцианом и получение рекомбинантного SST. Гибридный белок растворяли (10 мг/мл) в буфере В. После добавления 50-кратного молярного избытка дитиотреита (в расчете на S—S-связь) раствор насыщали газообразным азотом и инкубировали 4 ч при 37° С. Затем белковый раствор разбавляли буфером В в 3—4 раза и диализовали в течение 20 ч против 0,01 М NH_4HCO_3 при 20° С. Сформировавшийся осадок собирали центрифугированием (12 000g, 15 мин) и использовали для расщепления бромцианом.

Осадок гибридного белка растворяли (10 мг/мл) в 80% муравьиной кислоте и добавляли кристаллический бромциан (2 мг/мг белка). Инкубацию проводили при 20° С без доступа света в течение 20 ч. По завершении реакции реакционную смесь разбавляли 5—10 объемами воды и лиофильно высушивали.

Смесь пептидов, полученную в результате гидролиза гибридного белка бромцианом, растворяли в 20—50 мл буфера Г, центрифугировали и супернатант наносили на колонку (2,6×100 см) с сефадексом G-50, уравновешенную буфером Д. Выявление SST в элюированных фракциях проводили радиоиммунологическим методом после их предварительного обессоливания с помощью ОФ ВЭЖХ.

Все процедуры, связанные с использованием ВЭЖХ, выполняли на приборе фирмы Gilson. Фракции, элюированные с колонки G-50, обессоливали с помощью ОФ ВЭЖХ на колонке Биохром C₇ (8×250 мм, ВНИИОЧБ, Санкт-Петербург). Элюцию проводили в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1 М NH_4HCO_3 .

Фракции, содержащие SST, очищали с использованием препаративной колонки Диасорб 130 C₁₆ (10×150 мм, НПП «Элсико», Москва), уравновешенной 0,1% ТФА.

Элюцию проводили в градиенте концентрации ацетонитрила 0—25% за 5 мин и 25—34% за 36 мин со скоростью потока 2 мл/мин.

Идентификацию изоформ SST с помощью колонки Nucleosil C₁₈ (4,6×150 мм, НПП «Элсико», Москва) проводили в градиенте концентрации ацетонитрила от 10—28% за 2 мин и 28—34% за 36 мин со скоростью элюции 1 мл/мин.

Анализ хроматографической подвижности и гомогенности препарата циклического SST проводили на колонке Nucleosil-1000 pst (3×150 мм, НПП «Элсико», Москва), уравновешенной 0,1% TFA, содержащей 10% ацетонитрила, в градиенте ацетонитрила 10—26% за 2 мин, 26—30% за 24 мин со скоростью потока 0,6 мл/мин.

Ренатурацию рекомбинантного SST выполняли по методу Ривьера [14]. Ацетонитрил, содержащийся во фракции с SST в восстановленной форме, удаляли под вакуумом. Полученный концентрированный белковый раствор разбавляли 0,01 М HCOONH₄ (рН 6,8) до концентрации SST 100 мкг/мл и выдерживали 48 ч в темноте при 8° С. После этого к раствору добавляли концентрированный NH₄OH до рН 8,0, интенсивно перемешивали несколько часов при 20° С и анализировали с помощью ОФ ВЭЖХ.

Аминокислотный состав препарата SST определяли с помощью аминокислотного анализатора фирмы Biotronic LC-7000 (Germany). К 10 мкг соматостатина добавляли 100 мкл 5,7 н. HCl и гидролиз проводили при 110° С в течение 24 ч.

N-Концевую аминокислоту SST определяли дансильным методом с помощью тонкослойной хроматографии на полиамидных пластинах (3,5×3,5 см) [21].

Радиоиммунологическое тестирование SST выполняли с помощью коммерческих наборов фирмы Incstar (США).

Биологическую активность SST исследовали на первичных культурах клеток соматотрофов, изолированных из аденомы гипофиза человека, секретирующей СТГ. Ткань аденомы получали при хирургическом удалении опухоли. Методы получения, а также морфофункциональная характеристика использованных культур представлены ранее [22, 23]. В качестве стандарта использовали SST фирмы Serwa. Препараты вводили в среду инкубации 6-дневных культур в концентрациях 10 нг/мл. Через 24 ч в инкубационной среде определяли содержание СТГ с помощью специфической радиоиммунологической системы [24].

Авторы выражают благодарность д-ру мед. наук И. С. Комолову, д-ру биол. наук А. А. Булатову и канд. биол. наук Г. П. Елизаровой (Институт экспериментальной эндокринологии ЭНЦ РАМН, Москва) за проведение исследований биологической активности генно-инженерного препарата соматостатина, а также М. Л. Ходуну (НИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Москва) за проведение иммунологического тестирования препарата рекомбинантного соматостатина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brazeau P., Vale W., Burgus R., Zing N., Butcher M., Rivier J., Guilleman R. // Science. 1973. V. 179. № 4068. P. 77—79.
2. Spencer Y. S. Y., Williamson E. D. // Anim. Prod. 1981. V. 32. P. 376.
3. Vicini J. L., Clark J. H., Hurley W. L., Bakr J. M. // J. Anim. Sci. 1986. V. 63. Suppl. 1. P. 242.
4. 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.
5. Kleid D. G., Yansura D. G., Heyneker H. L., Miozzari G. F. Eur. Pat. Appl. 1981. EP. 0036776.
6. Bittner M. I. Eur. Pat. Appl. 1983. EP 0108045.
7. Canosi U., De Fazio G., Villa S., Domini S. Eur. Pat. Appl. 1985. EP 0160190.
8. Ueda I., Niwa M., Saitoh Y., Satoh S., Yamada H. Eur. Pat. Appl. 1986. EP 0197558.
9. Шишкина А. А., Гусева Е. А., Карпов В. А., Лукин В. Г., Авдонина Т. А., Тихонов Ю. Н., Шемидон, Швачкин Ю. П., Панков Ю. А. // Химия природн. соедин. 1988. № 4. С. 614—616.
10. Кашлев М. Б., Васс И. А., Лебедев А. Н., Каляева Э. С., Никифоров В. Г. // Генетика. 1989. Т. XXV. № 3. С. 396—401.

11. *Rassel T. R., Bennet G. N. // Gene. 1982. V. 20. P. 231—237.*
12. *Marston F. A. O. // Biochem. J. 1986. V. 240. P. 1—12.*
13. *Alton N. K., Vapnek D. // Nature. 1979. V. 282. № 20/27. P. 864—869.*
14. *Rivier J. E. F. // J. Amer. Chem. Soc. 1974. V. 96. P. 2986—2992.*
15. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.*
16. *Клонирование ДНК. Методы // Ред. Д. Гловер. М.: Мир, 1988. С. 154—163.*
17. *Махат А. М., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499—560.*
18. *Карнов В. А., Лунин В. Г., Тихоненко Т. И. // Молекуляр. генетика, микробиол. и вирусол. 1989. № 9. С. 28—33.*
19. *Laemmly U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.*
20. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265—275.*
21. *Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды, белки. М.: Мир, 1984. С. 165—241.*
22. *Комолов И. С., Булатов А. А., Трунин Ю. К., Серпуховитин С. Ю., Марова Е. И., Дедов И. И. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1992. Т. 113. № 4. С. 421—424.*
23. *Булатов А. А., Комолов И. С., Смичнова Н. Б., Трунин Ю. К., Серпуховитин С. Ю., Дзеранова Л. К., Марова Е. И., Дедов И. И. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1992. Т. 113. № 4. С. 406—409.*
24. *Булатов А. А., Елизарова Г. П., Осипова Т. А., Киселева А. Г. // Гормон роста человека. Пуццино, 1988. С. 64—69.*

Поступила в редакцию
1.X.1992

После доработки
28.I.1993

S. K. Karpova, E. T. Sazina, V. S. Karasev, L. B. Bader,
O. V. Sergienko*, A. A. Shishkina, Y. P. Shvachkin, V. G. Lunin*,
T. I. Tikhonenko*, Y. A. Pankov*

SYNTHESIS OF SOMATOSTATIN IN *ESCHERICHIA COLI* CELLS. ISOLATION AND CHARACTERISTICS

*Institute of Experimental Endocrinology,
National Endocrinological Centre, Moscow;*

** Scientific Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow*

A synthetic gene coding for somatostatin-14 (SST) was cloned in plasmid expression vectors in frame with the chloramphenicol acetyl transferase (CAT) gene, both genes being divided by a Met residue. The hybrid gene was expressed under the control of the CAT gene promoter (P_{cat}) or the tryptophan operon promoter (P_{trp}). The fused genes gave unsoluble polypeptide products amounting from 5% of the total cellular protein under constitutive biosynthesis conditions (P_{cat}) to 30% upon induction (P_{trp}). SST was liberated from the fused polypeptide by treatment with cyanogen bromide, purified to homogeneity by gel-filtration and reverse phase HPLC, and finally refolded by dilution and air oxidation. The renatured recombinant SST showed the specific biological and immunological activities of the native peptide.