



УДК 577.113.6:577.213

ЭКСПРЕССИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ГЕНА АНГИОГЕНИНА ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ *E. coli*

© 1996 г. А. А. Никонова[#], С. В. Серегин*, Н. А. Чикаев, В. П. Мишин,
И. Н. Бабкина*, Н. П. Мертвецов

Институт биоорганической химии СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

* Научно-исследовательский институт молекулярной биологии, пос. Кольцово Новосибирской обл.

Поступила в редакцию 26.03.96 г.

Синтетический ген, кодирующий ангиогенин человека, был клонирован в плазмиде pRTang под контролем *recA*-промотора *Proteus mirabilis*. Клетки *E. coli*, трансформированные плазмидой pRTang, после индукции митомизином С продуцировали дополнительный белок с молекулярной массой 14,2 кДа. По данным электрофоретического и иммунохимического анализов, полученный белок полностью соответствует ангиогенину человека.

Ключевые слова: ангиогенин, экспрессия гена в *E. coli*, *recA*-промотор *Proteus mirabilis*.

Ангиогенин, белковый фактор, индуцирующий рост кровеносных сосудов в опухолевых тканях [1], обнаруживается также в крови и в нормальных тканях здоровых людей [2, 3]. Хотя в настоящее время биологическая роль ангиогенина окончательно не установлена, интерес к нему весьма значителен, прежде всего из-за перспектив создания на его основе эффективных препаратов для лечения ран, язв, ожогов и т.д. Для изучения терапевтического эффекта ангиогенина в биологических системах необходимо иметь этот белок в достаточном количестве, однако его препараты пока труднодоступны.

Ранее сообщалось об экспрессии в *E. coli* как природного гена ангиогенина, полученного на основе кДНК [4], так и различных вариантов его синтетических генов [5, 6]. Тем не менее проблеме эффективной прямой экспрессии этого гена нельзя считать полностью решенной. Так, в работе Шапиро и др. [6] уровень экспрессии синтетического гена ангиогенина составил 2 мг белка/л культуральной среды, что эквивалентно всего лишь 0,02% суммарного клеточного белка [7].

В наших предыдущих работах [8, 9] описана экспрессия синтетического гена ангиогенина в виде гибридного белка β -галактозидаза–ангиогенин. Системы биосинтеза белков в виде гибридов имеют определенные достоинства, но также и серьезные недостатки, связанные прежде всего с необходимостью химической или ферментативной обработки химерной молекулы для отщепления рекомбинантного белка. Немаловажную проблему представляет при этом очистка целевого белка.

В продолжение работ [8, 9] нами была принята попытка осуществить прямую экспрес-

сию упомянутого гена в клетках *E. coli* в составе плазмидного вектора. Вначале для этой цели нами были использованы наиболее распространенные векторные системы с *lac*- или *tac*-промотором (соответственно плазмиды pUC18 и pKK223-3). В эти плазмиды был встроены синтетический ген ангиогенина из бактериофага M13 mp8-ang [8]. Полученными рекомбинантными плазмидами трансформировали несколько различных штаммов *E. coli*, после чего плазмидосодержащие клетки индуцировали изопропил- β -D-тиогаалактозидом и анализировали их белковый состав. Хотя с использованием этих векторов описано множество удачных примеров экспрессии, получить сколько-нибудь заметной продукции рекомбинантного ангиогенина нам не удалось.

Успешная экспрессия генов интерлейкина-2 (IL-2) человека и его мутантных аналогов, а также некоторых других генов под контролем *recA*-промотора *P. mirabilis* [10–12] побудила нас использовать этот промотор для наших целей. В качестве вектора мы использовали рекомбинантную плазмиду pRTU1, полученную ранее на основе плазмиды pRIL3 [10], в которой ген IL-2 был заменен фрагментом ДНК, содержащим *trpA*-терминатор *E. coli* с предшествующим ему полилинкерным участком, предназначенным для клонирования генов. Синтетический ген ангиогенина из бактериофага M13 mp8-ang [8] был встроены в этот вектор по сайтам *EcoRI* и *HindIII* под контроль *recA*-промотора *P. mirabilis* с образованием плазмиды pRTang (рис. 1). ρ -Независимый терминатор триптофанового оперона *E. coli*, расположенный в 3'-фланкирующей области гена ангиогенина в составе полученной экспрессионной плазмиды, предназначен для эффективной терминации транскрипции.

[#] Автор для переписки.

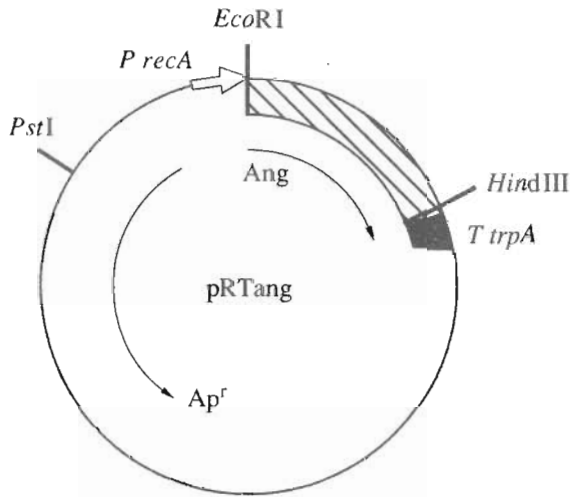


Рис. 1. Структура плазмиды pRTang.

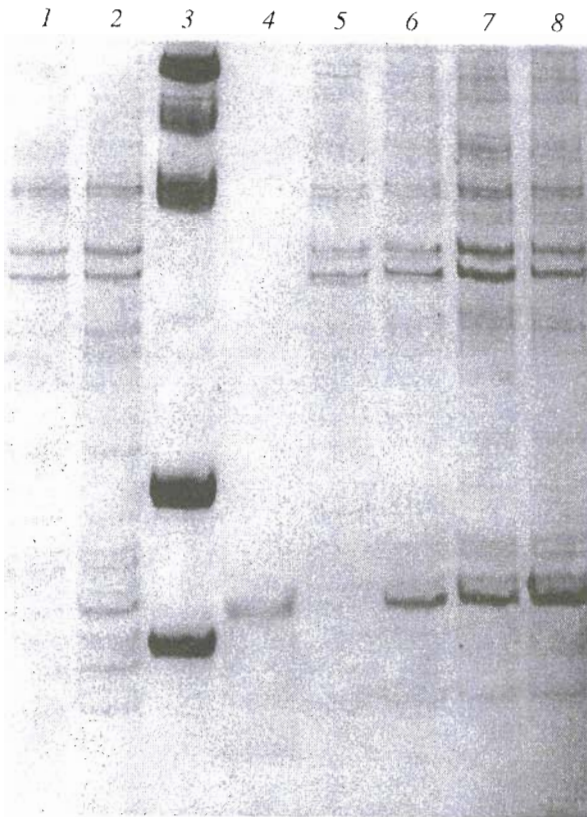


Рис. 2. Экспрессия гена ангиогенина человека в клетках *E. coli* VL1222, трансформированных плазмидой pRTang (электрофорез в 15% SDS-ПААГ): 1 – лизат клеток без индукции *recA*-промотора; 2 – лизат клеток после 6 ч индукции митомцином С; 3 – набор маркеров молекулярных масс (кДа, сверху вниз: 132; 94; 66; 20.1; 13.7); 4 – ангиогенин; 5 – клеточный дебрис (без индукции); 6, 7 и 8 – то же что 2, 6 и 12 ч индукции.

Выбор штамма-хозяина, условий культивирования и индукции проводился аналогично описанному ранее для экспрессии в подобной системе других генов [10, 11]. Проведенные в дальнейшем эксперименты показали, что полученная плазмида pRTang действительно обеспечивает экспрессию гена ангиогенина в клетках *E. coli*. Максимальный уровень синтеза рекомбинантного белка, кодируемого плазмидой pRTang, наблюдался в штамме *E. coli* VL1222 с пониженной способностью к внутриклеточному протеолизу (рис. 2, 2). По данным электрофоретического анализа в 15% SDS-ПААГ, доля ангиогенина в суммарном клеточном белке после индукции митомцином С составила в различных экспериментах 0.5–1.5%. Такой уровень продукции рекомбинантного белка считается достаточным для его промышленного получения, как, например, в случае инсулина [13]. Иммуноспецифичность продукта экспрессии была доказана методом иммуноблоттинга с использованием моноклональных антител к ангиогенину человека (рис. 3, 2). Рекомбинантный белок накапливается в бактериальной клетке в составе нерастворимых тел включения и составляет 20–30% суммарного белка грубого клеточного дебриса (рис. 2, 6–8).

Таким образом, нам удалось осуществить эффективную прямую экспрессию гена ангиогенина человека в клетках *E. coli*. Мы продолжаем характеризовать продукт экспрессии и разрабатываем технологию препаративного получения рекомбинантного ангиогенина для медико-биологических исследований.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали штаммы *E. coli* JM103 и VL1222 (из коллекции ВНИИ генетики), плазмидные ДНК pUC18, pKK223-3 и pRTU1 [10]. Эндонуклеазы рестрикции и ДНК-лигаза были получены в НИКТИ БАН (г. Бердск), ангиогенин – препарат производства ИПЭ “Ферментас” (Вильнюс).

Клонирование ДНК. Трансформацию клеток *E. coli*, выделение и рестрикционный анализ плазмидных ДНК проводили стандартными методами [14].

Условия культивирования и индукции. Клетки VL1222, трансформированные плазмидой pRTang, выращивали в минимальной обогатщенной среде M9CA [14], содержащей ампициллин в концентрации 50 мкг/мл при 30–32°C. Аликвоту ночной культуры вводили в соотношении 1 : 50 в свежую среду и культивировали с аэрацией до поглощения $A_{550} 1.0 \pm 0.1$, после чего культуру индуцировали добавлением митомцина С до концентрации 2 мкг/мл и продолжали культивирование в течение 2–12 ч.



Рис. 3. Иммуноблоттинг лизата клеток *E. coli*, трансформированных плазмидой pRTang, с использованием моноклональных антител к ангиогенину: 1 – лизат клеток без индукции *recA*-промотора; 2 – лизат клеток после 6 ч индукции митомицином С; 3 – ангиогенин.

Выделение телец включения. После индукции митомицином С содержащие плазмиду pRTang клетки *E. coli*, выращенные в 50 мл, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 20 мл буфера (0.2 М трис-НСl, рН 7.5, 0.2 М NaCl, 0.01 М ацетат натрия, 0.01 М β-меркаптоэтанол и 5% глицерин), после чего разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе (8–10 раз по 10–15 с при 22 кГц). Лизат центрифугировали при 5000–10000 об/мин и полученный осадок использовали для анализа белкового состава.

Электрофоретический анализ белков проводили в 15% SDS-ПААГ в буферной системе Лэммли [15].

Иммуноблоттинг осуществляли как описано в работе [16].

Авторы глубоко признательны Н.В. Чешенко (НИИ МБ, Кольцово Новосибирской обл.) за проведение иммуноблоттинга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fett J.W., Strydom D.J., Lobb R.R., Alderman E.M., Bethune J.L., Riordan J.F., Vallee B.L. // *Biochemistry*. 1985. V. 24. P. 5480–5486.
2. Shapiro R., Strydom D.J., Olson K.A., Valle B.L. // *Biochemistry*. 1987. V. 26. P. 5141–5146.
3. Weiner H.L., Weiner L.H., Swain J.L. // *Science*. 1987. V. 237. P. 280–282.
4. Kurachi K., Rybak S.M., Fett J.W., Shapiro R., Strydom D.J., Olson K.A., Riordan J.F., Davie E.W., Vallee B.L. // *Biochemistry*. 1988. V. 27. P. 6557–6562.
5. Deneffe P., Kovarik S., Guitton J.-D., Cartwright T., Mayaux J.-F. // *Gene*. 1987. V. 56. P. 61–70.
6. Shapiro R., Harper J.W., Fox E.A., Jansen H.W., Hein F., Uhlmann E. // *Anal. Biochem.* 1988. V. 175. P. 450–451.
7. Hsiung H.M., Mayne N.A., Becker G.W. // *Bio/Technol.* 1986. V. 4. P. 991.
8. Коваленко С.П., Горн В.В., Каргинов В.А., Морозов И.В., Зарытова В.Ф., Мертвецов Н.П. // *Биоорганическая химия*. 1988. Т. 14. С. 910–915.
9. Коваленко С.П., Лисняк И.А., Мертвецов Н.П. // *Биоорганическая химия*. 1989. Т. 15. С. 492–498.
10. Серегин С.В., Данилюк Н.К., Синяков А.Н., Камынина Т.П., Ильюкова Л.В., Сахно Л.В. // *Молекулярная биология*. 1993. Т. 27. С. 72–80.
11. Серегин С.В., Синяков А.Н., Поздняков С.Г., Козлов Ю.В., Сахно Л.В., Леплина О.Ю., Номоконова Н.Ю. // *Молекулярная биология*. 1993. Т. 27. С. 763–772.
12. Серегин С.В., Синяков А.Н., Поздняков С.Г., Камынина Т.П., Козлов Ю.В., Сахно Л.В., Сандахчиев Л.С. // *Докл. РАН*. 1992. Т. 325. С. 1081–1084.
13. Sofer G. // *Bio/Technol.* 1984. V. 2. P. 1035.
14. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. *Молекулярное клонирование*. М.: Мир, 1984. С. 10–386.
15. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
16. Муравлев А.И., Порываева В.А., Решетников С.С. // *Молекулярная генетика*. 1989. № 10. С. 19–24.

Expression of a Synthetic Human Angiogenin Gene in *Escherichia coli* Cells

A. A. Nikonova**, S. V. Seregin**, N. A. Chikaev*, V. P. Mishin*,
I. N. Babkina**, and N. P. Mervetsov*

*Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

**Research Institute of Molecular Biology, pos. Kol'tsovo, Novosibirsk oblast, Russia

Abstract—A synthetic gene for human angiogenin was cloned into pRTang under control of the *Proteus mirabilis recA* promoter. After induction with mitomycin C, *Escherichia coli* cells transformed with pRTang produced an additional 14.2-kDa protein. According to electrophoretic and immunochemical analyses, this protein was identical to human angiogenin.

Key words: angiogenin, expression in *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis recA* promoter.