



Me

## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.962.32.02

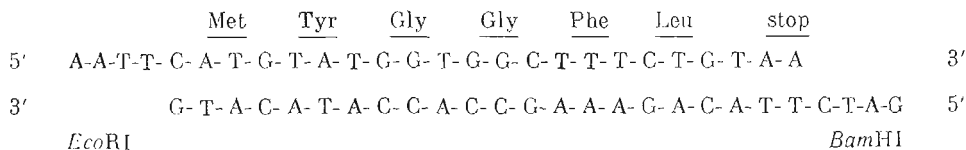
### КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ГЕНА ЛЕЙЦИНЭНКЕФАЛИНА В КЛЕТКАХ *E. coli*

Свердлов Е. Д., Долганов Г. М., Монастырская Г. С.,  
Ходкова Е. М., Честухин А. В., Шемякин М. Ф.

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

Развитие генной инженерии открыло принципиально новую возможность применения обычных микробиологических методов для получения практически ценных веществ пептидно-белковой природы. Приемы генной инженерии в перспективе могут быть использованы для массового микробиологического производства очень пужных для медицины, но сейчас трудно доступных пептидных гормонов, например таких, как нейропептиды или инсулин человека. Недавно Бойеру с сотр. в США удалось сконструировать штаммы кишечной палочки, содержащие искусственные гены соматостатина [1] и инсулина человека [2], способные синтезировать соответствующие гормоны. Их подход заключается в следующем. Синтезированный химическим путем ген заданного пептида встраивают в векторную плазмиду вместе с начальным фрагментом *lac*-оперона, содержащим большую часть гена  $\beta$ -галактозидазы и промоторную зону. Экспрессия рекомбинантного оперона после введения этой плазмиды в бактериальную клетку приводит к образованию химерных молекул белка, содержащих большую часть полипептидной цепи  $\beta$ -галактозидазы и следующую за ней аминокислотную последовательность заданного пептида, разделенные метионином. Кодон метионина вводится в начальную часть синтетического гена для обеспечения возможности отделить кодируемый им пептид от  $\beta$ -галактозидазы путем бромцианового расщепления.

Этот подход достаточно универсален и может быть использован для синтеза других пептидов в бактериальных клетках. Учитывая практическую значимость проблемы и используя подход Бойера, мы исследовали возможность синтеза в клетках *E. coli* другого важного гормона, лейцинэнкефалина, представляющего собой пентапептид Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu. Химический синтез гена лейцинэнкефалина, дополненного необходимыми последовательностями, был осуществлен в нашем институте В. А. Ефимовым и О. Г. Чахмахчевой [3]:



В качестве источника фрагмента *lac*-оперона, к которому подшивается синтетический ген, мы использовали ДНК харонового фага Ch4A [4]. При расщеплении этой ДНК рестрикционной эндонуклеазой *EcoRI* образуется всего три фрагмента, из которых только требуемый имеет оба *EcoRI*-специфичных конца. Это обстоятельство дает преимущества фагу Ch4A по сравнению с фагом  $\lambda$ *plac5*, использованным в работах [1, 2], увеличивая выход требуемых рекомбинантов при последующих операциях. При соединении  $\beta$ -галактозидазного *EcoRI*-конца фрагмента *lac*-оперона с *EcoRI*-концом синтетического гена энкефалина обеспечивается совпадение их кодовых рамок.

В качестве вектора мы использовали плазмиду *pBR322* [5]. В результате действия эндонуклеаз *BamHI* и *EcoRI* кольцевая *pBR322*-ДНК расщепляется на два неравных линейных фрагмента, меньший из которых представляет собой  $\sim 1/3$  локуса *Tc<sup>r</sup>*, существенную для проявления его признака, а нужный нам, больший фрагмент — всю остальную часть плазмиды. При соединении синтетического гена с последним фрагментом за счет *BamHI*-липких концов образуется молекула с двумя *EcoRI*-липкими концами, которая замыкается в цикл, взаимодействуя с *EcoRI*-фрагментом, содержащим *lac*-оперон. Поскольку в данном случае число вариантов соединения фрагментов ДНК невелико, а требуемая гибридная плаزمид имеет ряд характерных селективных признаков, мы, не выделяя интересных нас фрагментов, использовали в одноэтапной T4-ДНК-лигазной реакции с синтетическим геном непосредственно эндонуклеазные перевары ДНК *pBR322* и Ch4A. Это значительно упростило процедуру конструирования. Полученной смесью трансформировали клетки *E. coli* HB101 [6] по методу [7]. Селекцию рекомбинантных клонов проводили при рассеивании на чашках, отбирая колонии, которые одновременно устойчивы к ампициллину, чувствительны к тетрациклину и обладают конститутивным синтезом  $\beta$ -галактозидазы [8]. Всего было получено 500 таких колоний.

Клетки 12 клонов были размножены и из них была выделена плазмидная ДНК [9], которую подвергли анализу с помощью эндонуклеаз рестрикции. Продукты расщепления разделяли электрофорезом в агарозном геле. В конструируемой плазмиде должно содержаться два *EcoRI*-сайта, ограничивающих фрагмент *lac*-оперона, вместо одного в *pBR322*. В то же время она не должна содержать *BamHI*-сайта, имеющегося в исходной *pBR322*, поскольку в синтетическом гене к соответствующему *BamHI*-липкому концу примыкает пара А·Т, а не G·C, и, следовательно, после его ДНК-лигазной сшивки с «правильным» концом не может возникнуть *BamHI*-сайт [10].

Использованные условия получения и отбора рекомбинантных плазмид приводят к двум ориентациям *lac*-фрагмента относительно гена энкефалина, причем экспрессия последнего возможна только тогда, когда он соединен с С-концом гена  $\beta$ -галактозидазы. Взаимная ориентация этих двух встроенных элементов была установлена следующим образом. Полученные плазмиды имеют по одному сайту узнавания для эндонуклеаз *HindIII* и *SalI*. *SalI*-сайт расположен недалеко от встроенного гена энкефалина в *pBR322*-части, а *HindIII* — внутри фрагмента *lac*-оперона поблизости от N-конца  $\beta$ -галактозидазного гена. Одновременное расщепление плазмиды обеими эндонуклеазами должно привести в случае требуемой ориентации к фрагментам с *M* 4,7 и 2,2 млн., а при противоположной ориентации — 6,5 и 0,4 млн. В четырех из восьми проверенных клонов взаимная ориентация синтетического гена и *lac*-фрагмента оказалась требуемой (плазмиды рЕК-1, рЕК-4, рЕК-6 и рЕК-9) и в трех — противоположной (плазмиды рЕК-2, рЕК-10 и рЕК-11). Нуклеотидная последовательность, соответствующая гену лейцинэнкефалина, была обнаружена в двух плаزمидях (рЕК-1 и рЕК-4) прямым анализом первичной структуры наименьшего *EcoRI*-*SalI*-фрагмента рекомбинантной ДНК по модифицированному [12] методу Максама — Гилберта [11].

Для определения экспрессии гена лейцинэнкефалина в полученных штаммах был проведен радиоиммунологический анализ, аналогичный описанному Бойером с соавторами для идентификации соматостатина [1]. Лейцинэнкефалин, меченный  $^{125}\text{I}$  по остатку тирозина, был получен путем iodирования с хлораммином-Т [13]. Меченый энкефалин специфически связывался с лейцинэнкефалиновой антисывороткой (Miles Laboratories Ltd), а добавление немеченого энкефалина снижало это связывание. Связывание меченого энкефалина с антисывороткой уменьшалось в присутствии обработанных  $\text{CaCl}_2$  клеточных экстрактов всех четырех клонов, несущих плазмиды с требуемой ориентацией синтетического гена относительно фрагмента *lac*-оперона, и не уменьшалось экстрактами всех трех клонов с противоположной ориентацией или штамма с исходной плазмидой pBR322. Результаты характерного эксперимента представлены в таблице, откуда видно также, что индукция *lac*-оперона изопропил- $\beta$ ,*D*-тиогалактозидом (ИПТГ) увеличивает экспрессию гена энкефалина с требуемой ориентацией. Таким образом, можно считать доказанным, что сконструированные нами плазмиды способны направлять синтез лейцинэнкефалина в клетках *E. coli*.

Конкурирующий агент	Связавшийся $^{125}\text{I}$ -энкефалин, имп/мин*	Конкурирующий агент	Связавшийся $^{125}\text{I}$ -энкефалин, имп/мин*
—	4810 ± 190	40 мкл pЕК-6	1030 ± 130
10 нмоль энкефалина	1530 ± 50	40 мкл pЕК-9	1220 ± 40
40 нмоль энкефалина	680 ± 40	40 мкл pЕК-2	4880 ± 30
10 мкл pЕК-1	2060 ± 180	40 мкл pЕК-11	4390 ± 160
40 мкл pЕК-1	1220 ± 70	40 мкл pЕК-10	4660 ± 120
10 мкл pЕК-1 + ИПТГ	1320 ± 180	40 мкл pЕК-10 + ИПТГ	4780 ± 240
40 мкл pЕК-4	1740 ± 110	40 мкл pBR322	4920 ± 70

\* За вычетом неспецифического связывания без антисыворотки 1640 ± 150 имп/мин.  
В отличие от работы [1] комплексы антиген-антитело тестировали на миллипоровых фильтрах HAWP (14). 10 мкл экстракта соответствует ~  $10^8$  клеток. Каждый результат — среднее из трех определений.

Работа выполнена в соответствии с требованиями «Временных правил безопасности работ с рекомбинантными ДНК» по классу К-3, с применением физического уровня защиты Ф-3 и биологического Б-1.

Авторы благодарны акад. Ю. А. Овчинникову за постоянный интерес, поддержку и критическое обсуждение работы, чл.-корр. АН СССР В. Т. Иванову за синтетический лейцинэнкефалин, чл.-корр. АН СССР Г. П. Георгиеву за помощь в организации экспериментальных исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A. D., Heyneker H. L., Bolivar F., Boyer H. M. (1977) *Science*, 198, 1056–1063.
2. Goeddel D. H., Kleid D. G., Bolivar F., Yansura D. G., Crea R., Hirose T. D., Kraszewski A., Itakura K., Riggs A. D. (1979) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76, 106–110.
3. Ефимов В. А., Чухмахчева О. Г. (1979) *Биоорганическая химия*, 5, 305–307.
4. Blattner F. R., Williams B. G., Blechl A. E., Denniston-Thompson K., Faber H. E., Furlong L. A., Grunwald D. O., Kiefer D. O., Moore D. D., Schumm J. W., Sheldon E. L., Smithies O. (1977) *Science*, 196, 161–169.
5. Bolivar F., Rodriguez R. L., Greene P. J., Betlach M. C., Heyneker H. L., Boyer H. W., Crosa J. H., Falkow S. (1977) *Gene*, 2, 95–113.
6. Bolivar F., Rodriguez R. L., Betlach M. C., Boyer H. W. (1977) *Gene*, 2, 75–93.
7. Mandel M., Higa A. (1970) *J. Mol. Biol.*, 53, 159–162.
8. Миллер Дж. (1976) *Эксперименты в молекулярной генетике*, под ред. С. И. Аликханяна, с. 50, «Мир», М.
9. Zaslaff M., Ginder G. D., Felsenfeld G. (1978) *N. A. Research*, 5, 1139–1152.

10. Roberts R. J. (1978) *Gene*, 4, 183-193.
11. Maxam A., Gilbert W. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 74, 560-564.
12. Баев А. А., Захарьев В. М., Красв А. С., Скрябин К. Г., Монастырская Г. С., Свердлов Е. Д., Овчинников Ю. А. (1978) *Биоорг. химия*, 4, 1563-1566.
13. Greenwood F. C., Hunter W. M., Glover J. S. (1963) *Biochem. J.*, 89, 114-123.
14. Duka T., Höllt V., Przewlocki R., Wesche D. (1978) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 85, 1119-1127.

Поступило в редакцию  
16.IV.1979

## CLONING AND EXPRESSION OF THE SYNTHETIC ENKEPHALINE GENE IN *E. COLI* CELLS

SVERDLOV E. D., DOLGANOV G. M., MONASTYRSKAYA G. S., KHODKOVA E. M.,  
CHESTUKHIN A. V., SHEMYAKIN M. F.

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

Chemically synthesized gene for Leu-enkephalin was fused to the *E. coli*  $\beta$ -galactosidase gene on the plasmid pBR322.

The *E. coli* cells were transformed with the recombinant plasmid DNA and a number of clones with lac promoter fragment and enkephaline gene were selected. The enkephaline was detected in transformed cells by radioimmunoassay after BrCN cleavage from  $\beta$ -galactosidase. The expression of the enkephaline gene was observed only in the clones containing plasmids with synthetic gene fused to the C-end of  $\beta$ -galactosidase gene.

---

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

---

Сдано в набор 20.04.79      Подписано в печать 30.05.79      Т-6638      Формат бумаги 70×108 $\frac{1}{16}$   
Высокая печать      Усл. печ. л. 14,0      Уч.-изд. л. 15,0      Бум. л. 5,0      Тираж 875 экз.      Зак. 1768

---

Издательство «Наука». 119717, ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21  
2-я типография издательства «Наука». 121099, Москва, Шубинский пер., 10