



УДК 577.112:577.113.6.088:547.963.32.057

© 1992 г.

С. В. Луценко, А. И. Гуревич, Л. Р. Птицын,  
Л. А. Рязанова, В. А. Смирнов

### СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ В *E. COLI* РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-3

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

Сконструирована плаزمида рТОЕ2IL3 (III), позволяющая осуществить экспрессию искусственного гена интерлейкина-3 человека (hIL3) в условиях индуцированного биосинтеза белка. Проведено сравнительное изучение уровня синтеза рекомбинантного белка в продуцентах на основе различных штаммов *E. coli*, содержащих экспрессионные плазмиды рТЕ2IL3 (I) (конститутивный биосинтез) или (II) (индуцированный биосинтез). Показана важность выбора оптимального сочетания генно-инженерной конструкции экспрессионной плазмиды и несущего ее штамма бактериальных клеток. Разработан простой и эффективный способ препаративного выделения, очистки и ренатурации рекомбинантного белка, накапливающегося в тельцах включения.

При разработке биотехнологических методов получения рекомбинантных белков важное значение имеет выбор оптимального сочетания генно-инженерной конструкции экспрессионной плазмиды и несущего ее штамма бактериальных клеток. Недавно мы сообщили [1] о получении в *E. coli* рекомбинантного интерлейкина-3 человека (hIL3) при экспрессии искусственного гена (*il3*), клонированного в плазмиде рТЕ2IL3 (I), в которой транскрипция гена осуществлялась под контролем промотора P<sub>VII</sub> и терминатора T фага fd и был использован усилитель трансляции гена 10 фага T7 (TREN) (рис. 1). Высокий уровень биосинтеза hIL3 с такой конструкцией экспрессионной плазмиды (конститутивный биосинтез) был получен в штаммах *E. coli* HB101 (*recA*) и SG20050 (*lon*), в которых его содержание достигало 30–40% тотального белка клетки; значительно менее продуктивными оказались штаммы TG1 (*recA*<sup>+</sup>) и VL902 (*lon*) (рис. 2). По-видимому, важную роль здесь играет соотношение скоростей процессов биосинтеза и деградации белка в различных штаммах. Образующийся hIL3 накапливался в виде телец включения, в которых его дальнейшая деградация затруднена. Высокопродуктивный штамм, однако, при продолжительном культивировании или многократных пересевах терял свою продуктивность вследствие сегрегации плазмиды, что, очевидно, обусловлено чрезмерным уровнем конститутивного биосинтеза рекомбинантного белка.

Поэтому для достижения высокого выхода рекомбинантного белка при одновременном повышении стабильности системы мы применили широко используемую схему биосинтеза с индукцией транскрипции на поздних стадиях роста культуры продуцента. С этой целью мы реконструировали плазмиду рТЕ2IL3 (I) и встроили в нее *Bam*HI/*Eco*RI-фрагмент плазмиды рКК223-3, содержащий промотор P<sub>lac</sub> и *lac*-оператор (O) [2], меж-

Сокращения: IPTG – изопропил-βD-тиогаляктозид, GnHCl – хлоридрат гуанидина, SDS – додецилсульфат натрия, GSH – глутатион восстановленный, GSSG – глутатион окисленный.

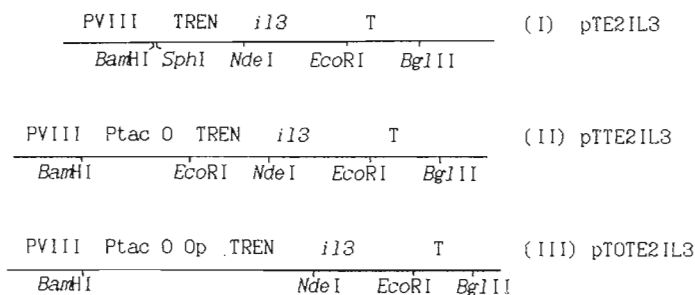


Рис. 1. Схема расположения гена *il3* и регуляторных участков в экспрессионных плаزمидях. Указаны сайты рестриктаз

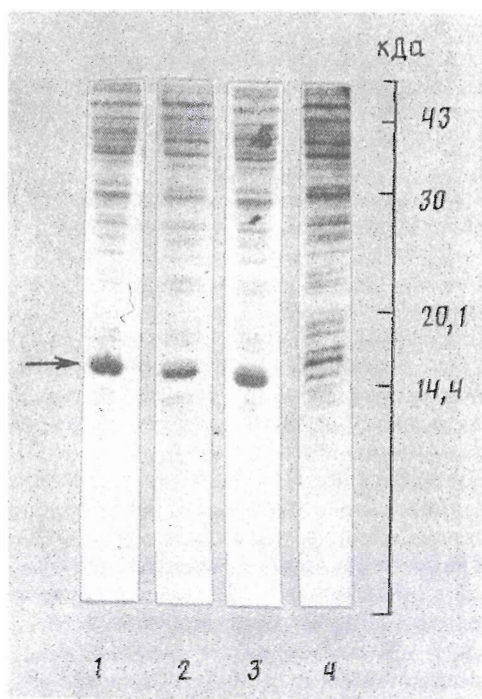


Рис. 2

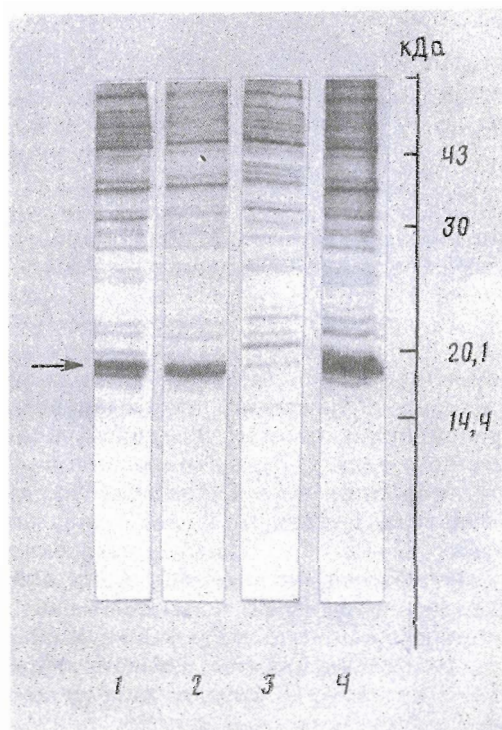


Рис. 3

Рис. 2. Электрофорез в ПААГ клеточных лизатов продуцентов hIL3 с плазмидой pTE2IL3 (I) в различных штаммах *E. coli*: 1 - HB101, 2 - TG1, 3 - VL902, 4 - SG20050. Здесь и на рис. 3-5 стрелкой отмечено положение полосы hIL3

Рис. 3. Электрофорез в ПААГ клеточных лизатов продуцентов hIL3 с плазмидами pTTE2IL3 (II) (колонки 1 и 2) и pTOTE2IL3 (III) (колонки 3 и 4) в *E. coli* TG1 без индукции IPTG (колонки 2 и 4) и после индукции через 4,5 ч (колонки 1 и 3)

ду сайтами рестриктаз *Bam*HI и *Sph*I, используя синтетический адаптер AATTCAATG. Однако полученная плазмидя pTTE2IL3 (II) в клетках *E. coli* TG1 оказалась неспособной обеспечить индуцируемый синтез hIL3: синтез белка интенсивно происходил и в отсутствие индуктора (IPTG), и накопление hIL3 почти не увеличивалось после индукции (рис. 3). Очевидно, наличие одного оператора (O) в конструкции (II) оказалось

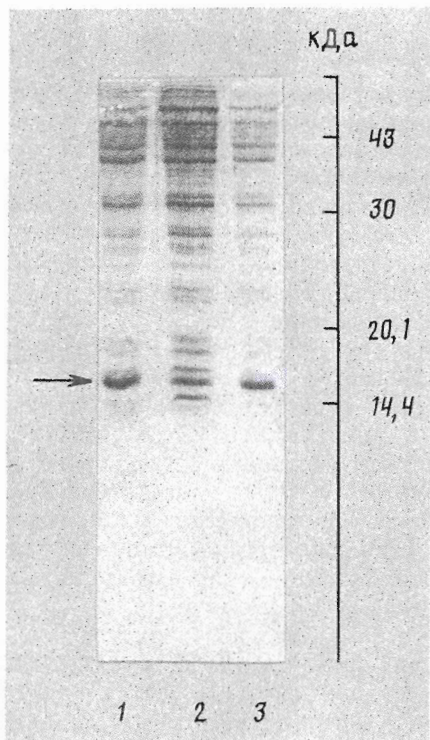


Рис. 4. Электрофорез в ПААГ клеточных лизатов продуцентов hIL3 с плазмидой рТОТЕ21L3 (III) в различных штаммах *E. coli*: 1 – TG1, 2 – JM105, 3 – JM109

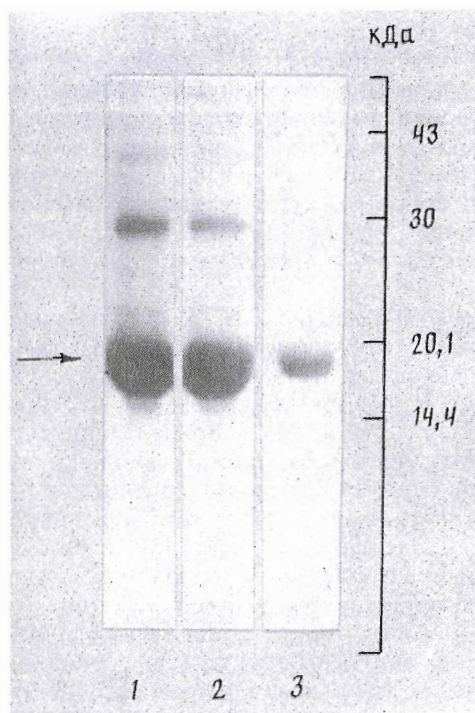


Рис. 5. Электрофорез в ПААГ препаратов hIL3 на различных стадиях очистки. 1 – тельца включения hIL3, 2 – препарат hIL3 после диализа, 3 – элюат с Nucleosil 300-7C<sub>4</sub>

недостаточным, чтобы ограничить транскрипцию с тандема двух промоторов  $P_{\text{VII}}$  и  $P_{\text{lac}}$ . Поэтому мы сконструировали плазмиду рТОТЕ21L3 (III), аналогичную плазмиде (II), используя вместо адаптера ААТТСАТГ синтетический оператор (Op). Тандем двух операторов



в конструкции (III) оказался достаточно эффективным, и рост продуцента (*E. coli* TG1 с плазмидой рТОТЕ21L3) без индуктора (IPTG) не приводили к образованию в клетках заметного количества рекомбинантного белка, но после индукции содержание образовавшегося hIL3 достигало 30–40% тотального белка клетки (рис. 3).

Сравнение уровней биосинтеза hIL3 в различных штаммах *E. coli*, суперпродуцентах *lac*-репрессора (TG1, JM105 и JM109), показало, что и здесь наблюдаются существенные различия в накоплении рекомбинантного белка, синтезируемого после индукции (рис. 4).

Таким образом, обе использованные нами системы биосинтеза hIL3 – индуцируемый синтез в продуценте *E. coli* TG1 с плазмидой рТОТЕ21L3 и конститутивный синтез в продуценте *E. coli* HB101 с плазмидой рТЕ21L3 – могли быть успешно использованы для получения рекомбинантного белка. При этом клеточная масса в первом случае (*E. coli* TG1) была больше, чем во втором, и суммарное количество hIL3, синтезируемого при этом в одинаковом объеме культуры, было выше. Однако во

втором случае (*E. coli* НВ101) оказалось, что hIL3 образует тельца включения с меньшим содержанием сопутствующих примесей, что существенно упрощает его дальнейшую очистку. В связи с этим мы исследовали возможности использования еще одной системы биосинтеза — в клетках *E. coli* НВ101, несущих две совместимые плазмиды, уже упомянутые рТ0ТЕ21L3 или рТТЕ21L3, а также рАСУС184lacI<sup>q</sup>, несущую ген *lac*-репрессора, присутствие которых обуславливает возможность проводить индуцируемый IPTG синтез в выбранном штамме клеток хозяина. Действительно, в продуцентах, полученных в результате совместной трансформации двумя плазмидами компетентных клеток *E. coli* НВ101, синтез рекомбинантного hIL3 не наблюдался в отсутствие индуктора, однако после индукции уровень синтеза был невысоким, сопоставимым с тем, который достигался в продуценте с *E. coli* JM105.

Ранее мы показали [3], что в клетках продуцента *E. coli* НВ101 образующийся hIL3 практически полностью кристаллизуется в тельцах включения. Эти образования обладают низкой растворимостью в воде и различных буферных системах в диапазоне рН 4—9. Агрегация молекул белка происходит в них в основном за счет межмолекулярных ионных и гидрофобных взаимодействий и не сопровождается формированием внутримолекулярных дисульфидных связей. В тельцах включения hIL3 присутствует в денатурированном состоянии.

Аналогичные тельца включения hIL3 с теми же свойствами денатурированного белка мы получили и в других продуцентах с описанными выше системами экспрессии. При этом мы внесли некоторые усовершенствования в процедуру выделения и очистки, которые, во-первых, делают легко доступным получение препаративных количеств рекомбинантного белка и, во-вторых, позволяют успешно применять ее не только для различных продуцентов hIL3, но, по-видимому, и в других случаях, когда рекомбинантный белок образует в *E. coli* тельца включения. Важным моментом здесь является получение препарата телец включения с минимальным содержанием примесей балластных белков, которые затем оказывают существенное влияние на эффективность солиubilизации денатурированного белка и препятствуют процессу ренатурации.

Для выделения телец включения hIL3 суспензию клеток продуцента в буфере А сначала обрабатывали лизоцимом и ДНКазой, а затем разрушали ультразвуком. Такая последовательность операций позволяет добиться полного разрушения клеток и облегчает очистку. После отмывок телец включения буферами В и А содержание hIL3 в препарате достигало 80%. Солюбилизация этого препарата в 5 М GнНСl позволила добиться практически полного растворения hIL3 в течение 1 ч.

Ренатурацию hIL3 в препаративных количествах удобнее оказалось проводить в растворе GнНСl в присутствии глутатиона. В избранных условиях (рН 8,5; 20°С) практически весь белок за 16 ч переходит в

#### Очистка и ренатурация hIL3

Стадия очистки	Количество	Суммарный белок	hIL3	Чистота	Выход
		г		%	
Влажные клетки *	100 г	17,4	5,2	30	100
Экстракт 5 М GнНСl	2 л	6,25	5,0	80	96
Ренатурация	10 л	2,7	2,4	90	46,1
Nucleosil 300-7C <sub>4</sub>	0,2 л	2,0	2,0	98	38,4

\* Для определения содержания суммарного белка и hIL3 во влажных клетках *E. coli* 1 г подвергали лизису в 8 М GнНСl.

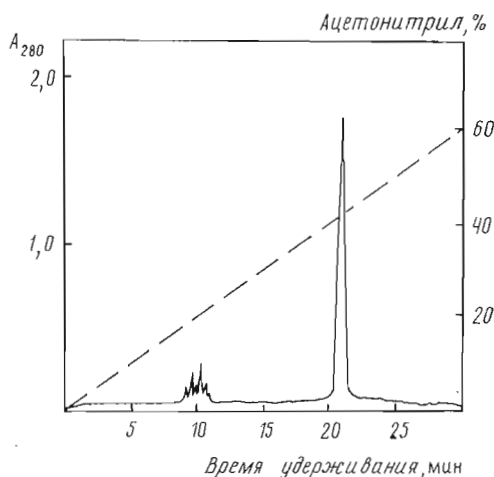


Рис. 6. Preparative разделение hIL3 на колонке с Nucleosil 300-7C<sub>4</sub>. Скорость потока 5 мл/мин

ренатурированную форму. Одновременно достигалась значительная очистка hIL3 за счет осаждения примесных белков (рис. 5). Процесс ренатурации контролировали с помощью метода Элмана [4] и определением биологической активности. Полученный препарат концентрировали с помощью ультрафильтрации и окончательно очищали ОФ-ВЭЖХ (рис. 6). Чистота hIL3, по данным интегрирования хроматографических пиков при аналитической ВЭЖХ, составила >98%, а его удельная биологическая активность —  $5 \cdot 10^6$  ед./мг (ср. работу [3]).

Результаты постадийной очистки hIL3 приведены в таблице. Предлагаемый метод выделения позволяет получать в preparative количестве биологически активный рекомбинантный hIL3 с выходом 38% (2 г белка из 100 г влажных клеток) при использовании лишь одной хроматографической стадии.

Авторы выражают благодарность Н. В. Скапцовой (СМП «Химтек») за синтез олигонуклеотидов и Н. В. Сониной (СМП «Химтек») за определение биологической активности препаратов hIL3.

### Экспериментальная часть

Использовали трис, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, SDS, EDTA, персульфат аммония, мочевины, кумасси R-250, GSH, GSSG, G<sub>n</sub>HCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ДАКазу I (Sigma); 2-меркаптоэтанол (Fluka); набор белков-стандартов для электрофореза (Pharmacia); ацетонитрил и трифторуксусную кислоту (Merck); лизоцим (Serva).

Условия экспериментов по конструированию плазмид приведены в работе [1]. Олигонуклеотиды для синтетического оператора и адаптер синтезированы Н. В. Скапцовой (СМП «Химтек», Москва).

Использованы штаммы *E. coli*: HB101 [F<sup>-</sup>, hsdS (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), recA, ara-14, proA, leu, thi, lacY, galK2, str, xyl-5, mtl-1, supE44]; SG20050 [lon, lac, Tc<sup>R</sup>]; TG1 [Δ(lac-pro), thi, supE, hsd-5/F', traD36, proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>, lacI<sup>q</sup>, lacZΔM15]; JM109 [recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, Δ(lac-pro)/F', traD36, proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>, lacI<sup>q</sup>, lacZΔM15]; JM105 [endA, thi, hsdR4,

*strA*, *sbcB15*,  $\Delta(lac-pro)/F'$ , *traD36*, *proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>*, *lacI<sup>c</sup>*, *lacZ* $\Delta$ M15]; VL902 [*hsdR<sup>-</sup>*, *hsdM<sup>+</sup>*, *gal*, *met*, *supE*, *lon*, *sulA*].

**Буферные растворы:** А — 50 мМ Na-фосфат, 1 мМ EDTA, pH 7,5; Б — 50 мМ Na-фосфат, 10 мМ EDTA, 4 М мочевины, 1% тритон X-100, pH 7,5; В — 50 мМ Na-фосфат, 1 мМ EDTA, 5 М GнHCl, pH 7,5.

В качестве контроля использовали набор стандартных белков фирмы Pharmacia: апротинин (6,5 кДа), цитохром с (12,4 кДа), ангидразу (29 кДа), альбумин (66 кДа) и альдолазу (158 кДа).

**Электрофорез** проводили по методу [5] в пластинах (9×12×0,04 см) 12,5% ПААГ в присутствии 0,1% SDS. Количественное определение содержания hIL3 в различных препаратах (см. таблицу) проводили в окрашенных кумасси R-250 гелях с помощью денситометрического сканирования на хроматосканере CS-930 (Shimadzu).

Концентрацию белка в растворе определяли по методу [6].

**Выделение hIL3.** Культуру продуцента выращивали в среде, содержащей 0,8% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта и 0,5% NaCl, в течение 18 ч при 37°С (для продуцента *E. coli* HB101 с плазмидой pTE2IL3) или (для продуцента *E. coli* TG1 с плазмидой pTOTE2IL3) до мутности  $A_{550}=0,8$ , после чего добавляли IPTG до 0,5 мМ и продолжали выращивание в течение 6 ч при 37°; клетки отделяли центрифугированием. Влажные клетки (100 г) суспендировали в 200 мл буфера А, добавляли лизоцим (100 мкг/мл), инкубировали 30 мин при 20°С, добавляли раствор MgCl<sub>2</sub> (до 10 мМ) и ДНКазу (10 мкг/мл), инкубировали при 20°С до потери вязкости (~30 мин), разбавляли 2 л буфера Б и центрифугировали 20 мин при 10 000 g. Осадок суспендировали в 2 л буфера Б с помощью ультразвукового дезинтегратора Sonifier 240 (Branson) и центрифугировали 20 мин при 10 000 g. Отмывку буфером Б повторяли еще раз, затем аналогично промывали буфером А. Осадок ресуспендировали в 2 л буфера В и инкубировали 1 ч при 20°С.

Полученный раствор разбавляли при перемешивании 8 л буфера А, доводили pH суспензии до 8,5 и добавляли смесь GSH и GSSG до концентрации 1,5 мМ. Ход окисления тиоловых групп в hIL3 контролировали с помощью метода Элмана [4]: аликвоты хроматографировали на колонке с Nucleosil 5C<sub>4</sub> (линейный градиент 0–60% ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте) пики hIL3 упаривали и определяли содержание свободных тиоловых групп по Элману. Ренатурацию считали завершённой при отрицательной реакции. По окончании окисления раствор концентрировали в ячейке для ультрафильтрации (Amicon) на мембране PM-10, добавляли трифторуксусную кислоту до 0,1% и центрифугировали 20 мин при 10 000 g. Осветленный раствор хроматографировали на препаративной колонке с Nucleosil 300-7C<sub>4</sub> (Masherey-Nagel) в линейном градиенте 0–60% ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте. Чистоту препарата оценивали с помощью SDS-электрофореза и обращенно-фазовой ВЭЖХ, как описано нами ранее [3].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гуревич А. И., Скапцова Н. В., Луценко С. В., Смирнов В. А., Куркин А. Н., Ажаев А. В. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 5. С. 647–652.
2. Atali E., Brosius J., Ptashne M. // Gene. 1983. V. 25. № 2–3. P. 167–178.
3. Луценко С. В., Гуревич А. И., Каневский В. Ю., Смирнов В. А., Назимов И. В., Ажикина Е. Л., Чернов И. П., Ростопшинов В. М., Сокина И. В., Ажаев А. В. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 12. С. 1649–1654.
4. Ellman G. L. // Arch. Biochem. and Biophys. 1959. V. 82. № 1. P. 70–77.
5. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5229. P. 680–685.
6. Bradford M. M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1–2. P. 248–254.

Поступила в редакцию  
11.VII.1991

*E. COLI* EXPRESSION SYSTEMS OF RECOMBINANT INTERLEUKIN-3

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

Plasmid pTOTE2IL3 (III) has been constructed, expressing an artificial human interleukin-3 (hIL3) gene under conditions of the induced protein biosynthesis. Levels of the recombinant protein synthesis have been compared in several *E. coli* strains containing expression plasmids pTE2IL3 (I) (constitutive biosynthesis) and (III) (induced biosynthesis). Optimal combinations of the expression plasmids and the bacterial strains are of importance. A simple and effective method has been elaborated for isolation, purification and renaturation of the recombinant protein accumulated in inclusion bodies.