



УДК 577.112.083.3:577.27

НОВЫЙ ШТАММ-ПРОДУЦЕНТ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ *E. coli*

© 2005 г. Е. В. Суровцева*, Т. В. Кузнецова*, В. Г. Хоменков*,
С. П. Домогатский**, А. Б. Шевелев**#

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,
119071, Москва, Ленинский просп., 33, строение 2;

**Институт экспериментальной кардиологии Кардиологического научного центра РАМН, Москва
Поступила в редакцию 29.11.2004 г. Принята к печати 28.02.2005 г.

Получен штамм *E. coli* – продуцент фактора некроза опухолей (TNF- α) человека с использованием частично оптимизированного по кодоновому составу полусинтетического гена и промотора фага T7. Продукт экспрессии накапливался в клетках в виде телец включения с выходом 50–70 мг/л среды культивирования. Рекомбинантный TNF- α в виде телец включения использовали для иммунизации крыс, в результате чего получена поликлональная антисыворотка. Полученные антитела проявляли специфичность в иммуноблоттинге в отношении антигена, использованного для иммунизации. Подобраны условия для ренатурации белка методом разбавления, обеспечивающие выход растворимого белка более 85%.

Ключевые слова: фактор некроза опухолей человека (TNF- α), экспрессия в *E. coli*, ренатурация; иммуноблоттинг.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в результате развития геномики остро встала проблема разработки универсальной методологии, позволяющей изучать биологические функции и распределение в организме продуктов вновь обнаруженных и слабо охарактеризованных генов. Иммунохимические и иммуногистохимические методы, такие, как иммуноблоттинг и ELISA, наряду с анализом транскриптов могут рассматриваться в качестве удобного подхода для проведения начальных экспериментов по локализации, оценке концентрации, исследованию посттрансляционных модификаций, модельной инактивации и выделения продуктов новых генов *in vivo*. В настоящей работе на примере белка TNF- α человека на основе стандартных методов экспрессии в *E. coli* в виде телец включения предложена схема получения продуктов интронированных геномных генов эукариот, а также экспресс-методика ренатурации таких белков.

TNF- α известен как цитокин макрофагального происхождения [1]. Он опосредует ряд местных и системных эффектов, может рассматриваться в качестве противоракового терапевтического агента

[2] и в качестве маркера при диагностике инфекционных и аутоиммунных заболеваний. Известны штаммы-продуценты TNF- α на основе *E. coli* [3]. Для их создания были использованы плазмидные векторы с низким уровнем индуцируемой транскрипции, позволяющие получать продукт с невысоким выходом. В настоящей работе мы предлагаем систему экспрессии на основе стандартного вектора pET23a (Novagen, США) с промотором колифага T7, позволяющую значительно повысить уровень продукции человеческого TNF- α в *E. coli* по сравнению с использованной ранее схемой экспрессии под контролем индуцибельного триптофанового промотора [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение экспрессионных конструкций. Экзон-интронная структура человеческого гена TNF- α была исследована на основании последовательности, депонированной в банке генов NCBI (номер доступа M26331). Первичный транскрипт TNF- α , кодируемый локусом в составе 6-й хромосомы человека, содержит 4 экзона. Лидерная последовательность кодируется экзоном 1 и частью экзона 2, зрелый TNF- α – тремя экзонами, из которых первые 2 имеют незначительную длину, кодируя в сумме лишь 23 а.о. Сходную экзон-интронную структуру имеют многие другие гены секреторных белков эукариот, в том числе ростовые факторы GM-CSF [NCBI X03020], фоллиста-

Сокращения: DAB – 3,3'-диаминобензидин \times 4 HCl; ELISA – иммуноферментный анализ (enzyme linked immune sorbent analysis); IPTG – изопропил- β -тиогаалактозид; TNF- α и TNF-R – фактор некроза опухолей α (tumor necrosis factor) и его рецептор.

Автор для переписки (эл. почта: shevelev@inbi.ras.ru; тел.: (095)-954-30-66).

тин [NCBI AN001463], инсулиноподобный фактор роста IGF1Ea [NCBI E01351].

Сборку гена, кодирующего зрелую форму TNF- α , проводили, комбинируя клонирование ПЦР-амплификата и сборку первых двух экзонов

TNF-3 (*Bam*HI) ggggatccgtaacccgcaggctgaggggcagctccagtg
 TNF-5 (*Xba*I) ggtctagagggaataatcccaagtag

Продукт ПЦР, полученный с использованием этой пары праймеров на матрице геномной ДНК человека, имел размер 436 п. о. Амплифицированный фрагмент был клонирован в экспрессионный вектор рЕТ23а (Novagen, США), в результате чего была получена промежуточная конструкция рTNF- α 1.

Недостающие в конструкции рTNF- α 1 два экзона (1 и 2) были получены ферментативным путем из синтетических олигонуклеотидов (рис. 1). Существуют наблюдения, свидетельствующие о значительном влиянии 5'-концевых кодонов, располагающихся в составе мРНК непосредственно вблизи старта трансляции на эффективность трансляции [5]. С учетом этого обстоятельства, восстанавливая участок кодирующей области, недостающий в составе конструкции рTNF- α 1, за счет клонирования синтетического ДНК-дуплекса мы заменили первые 5 кодонов гена человека на синонимичные им кодоны, предпочтительно используемые в *E. coli* (рис. 2). Так, Val, следующий за N-концевым остатком Met в природном человеческом гене, был заменен на Met. Первый аминокислотный остаток зрелого белка – Arg в природном человеческом гене кодировался бы чрезвычайно редким для *E. coli* кодоном AGA. В результате сборки полусинтетического гена TNF- α в составе конструкции рTNF5 кодон AGA был заменен на CGC, что не сказалось на аминокислотном составе зрелого продукта, получающегося в результате котрансляционного процессинга формилметионина, но потенциально могло привести к повышению уровня синтеза рекомбинантного белка в клетках *E. coli*. Следующие 3 кодона (для Ser, Ser, Ser) также были заменены на синонимичные. Синтетический фрагмент был внесен в состав конструкции рTNF- α 1, в результате чего получена конструкция рTNF5, кодирующая зрелый вариант TNF- α человека (рис. 2). Таким образом, был получен полусинтетический ген TNF- α , транскрибируемая область которого составила 489 п. о. (163 кодона).

Экспрессия в *E. coli*. По результатам анализа телец включения из биомассы соответствующих рекомбинантных штаммов обе плазмиды рTNF- α 1 и рTNF5 в условиях индукции IPTG вызывали накопление целевых белковых продуктов в клетках *E. coli*. Как правило, в *E. coli* удается получить

из синтетических олигонуклеотидов. Для клонирования ПЦР-фрагмента кодирующей области, соответствующего экзону 3 геномного гена TNF- α , была подобрана пара праймеров TNF-3 и TNF-5 (5' \rightarrow 3', жирным шрифтом отмечены сайты рестриктаз):

только полноразмерные белки или их интактные изолированные домены [5], тем не менее, в нашем случае при экспрессии конструкции рTNF- α 1 в *E. coli* удалось получить соответствующий белковый продукт. При этом участок, отсутствующий в продукте рTNF- α 1, по сравнению с полноразмерным зрелым TNF- α не составляет отдельного глобулярного домена [6]. Уровень продукции усеченного белка в нашей системе составлял 70–90 мг/л. Полноразмерный зрелый белок – продукт конструкции рTNF5 – также эффективно синтезировался в использованной системе. При этом уровень его продукции можно оценить как 50–70 мг/л (рис. 3).

В литературе приводится ряд данных об экспериментах по синтезу TNF- α человека в *E. coli*. Так, Шингаровой и соавт. [4] описана экспрессия TNF- α под контролем промотора триптофанового оперона *E. coli*, причем продукт экспрессии накапливался в цитоплазме в растворимом виде, а не формировал тельца включения. Однако уровень экспрессии при этом оказывался невысоким. Кроме того, выделение и очистка такого белка требовали нескольких стадий, что неизбежно сказывалось на конечном выходе [3].

Производство белка в нашей системе происходило под контролем индуцибельного промотора фага Т7. Поскольку ген ДНК-полимеразы фага Т7 в использованном нами штамме *E. coli* BL21(DE3) находился под контролем лактозоиндуцибельного промотора *lac-tac*, для запуска транскрипции в среду культивирования добавляли IPTG. При этом TNF- α накапливался в виде телец включения с достаточно высоким выходом.

Следует отметить, что мы модифицировали протокол экспрессии по сравнению с общеприня-

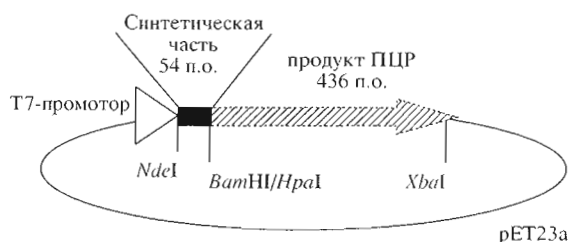


Рис. 1. Схема сборки полусинтетического гена TNF- α на базе плазмиды рЕТ23а.

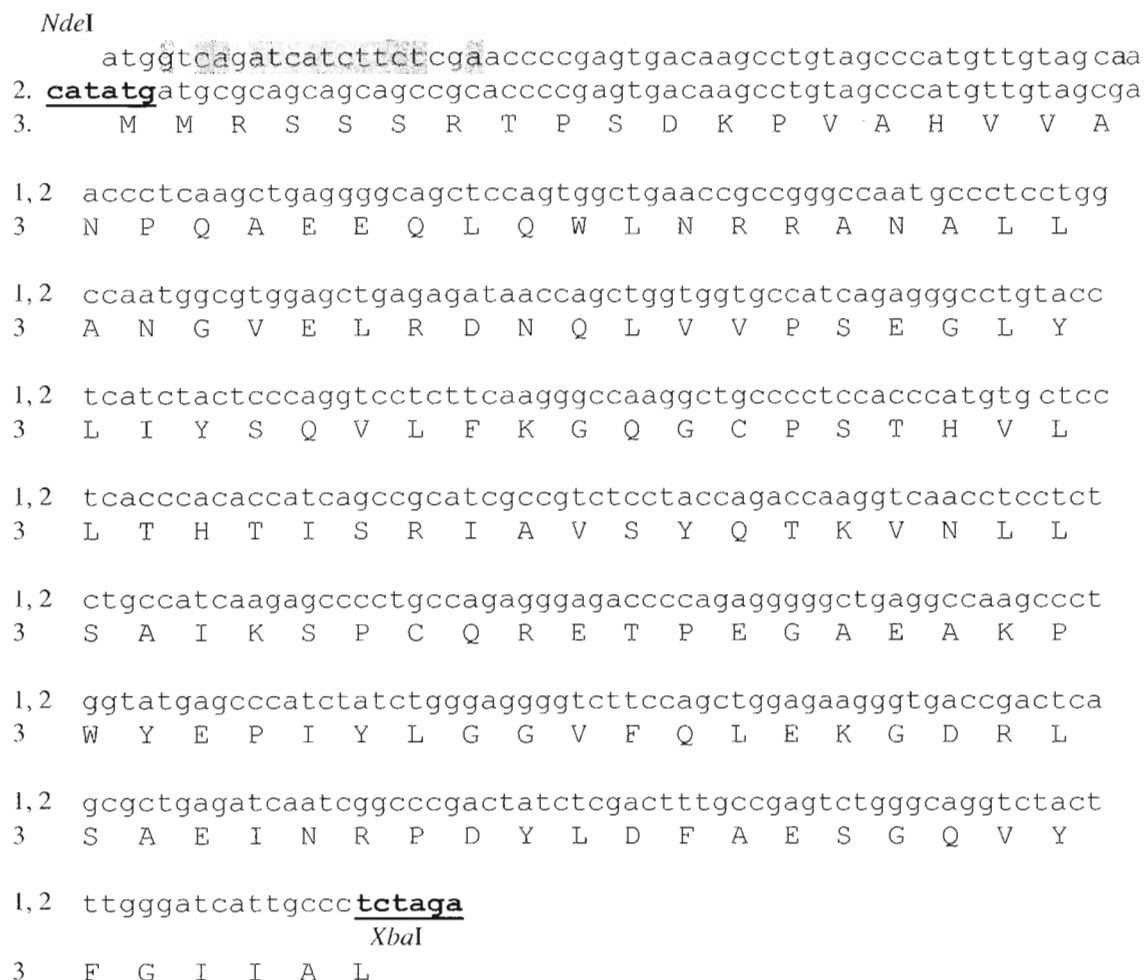


Рис. 2. Схема получения полусинтетического гена TNF- α человека в составе конструкции pTNF5: 1 – природный ген человеческого TNF- α ; 2 – полусинтетический ген, сконструированный в настоящей работе; 3 – аминокислотная последовательность, получаемая при трансляции полусинтетического гена. Серым цветом отмечены нуклеотидные позиции, подвергшиеся замене в процессе получения полусинтетического гена.

тым [7]. В настоящее время в литературе наиболее часто упоминается схема, при которой индуктор добавляется по достижении культурой оптической плотности $A_{680} = 0.4$ [7]. Мы обнаружили, что в разработанной нами системе IPTG может быть внесен одновременно с инокулятом, это не уменьшает продукцию белка, но позволяет сократить время ферментации.

Иммунизация животных рекомбинантным продуктом конструкции pTNF5 в виде телец включения. Получение антител к продукту того или иного вновь открытого гена с неизвестной функцией является актуальной задачей. Ее решение, однако, зачастую осложняется невозможностью эффективно ренатурировать продукт из телец включения [8]. Эффективность ренатурации, в свою очередь, сдерживается сложностью оценки белка по функциональной активности. Таким образом, антитела, полученные против агрегированного нерастворимого белка, могут служить

ценным инструментом на начальных этапах исследования локализации и функциональной активности вновь открытых генов и их продуктов. Некоторые авторы советуют обязательно ренатурировать рекомбинантный белок, предварительно полученный в виде телец включения [9]. Однако в последнее время появились работы, где в качестве антигена использовался непосредственно денатурированный белок [10]. Мы показали, что такой метод иммунизации животных применим и для человеческого TNF- α . Рекомбинантный TNF- α человека детально изучен в качестве антигена для иммунизации [6], поэтому он может рассматриваться как удобный модельный объект для изучения значения степени близости структуры к нативной на развитие гуморального иммунного ответа.

В настоящей работе мы использовали в качестве антигена для иммунизации интактные тельца включения, представляющие собой продукт

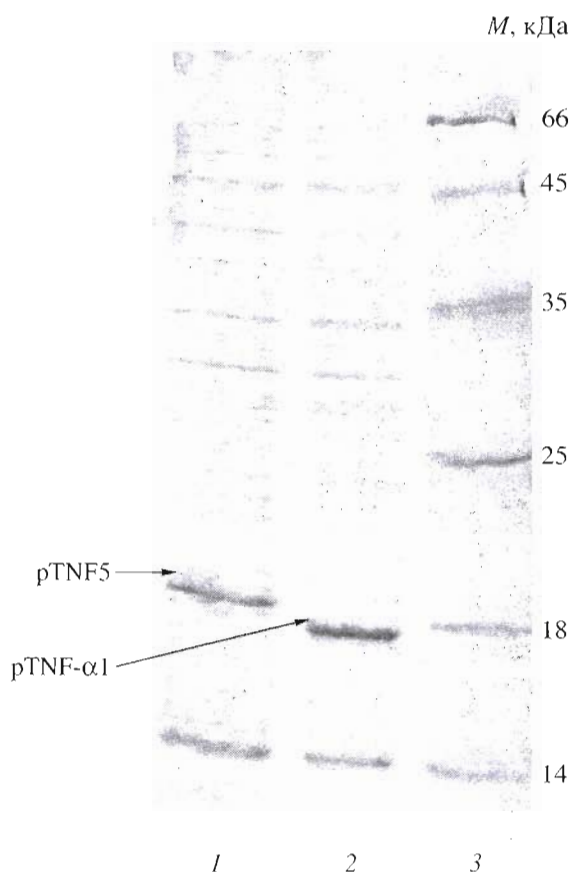


Рис. 3. Электрофорез в 12.5% SDS-ПААГ лизата биомассы экспрессионных штаммов *E. coli* BL21(DE3), несущих плазмиды rTNF5 (1) и rTNF- α 1 (2); 3 – стандарты молекулярной массы.

конструкции rTNF5 в виде водной суспензии. Иммунизацию крыс проводили в три этапа по стандартной схеме, широко применяющейся при работе с разнообразными природными и рекомбинантными белками в растворимой форме.

Поликлональную антисыворотку, полученную при иммунизации крыс тельцами включения, тестировали на способность связываться со специфическим антигеном в иммуноблоттинге. Было показано, что сыворотка без дополнительной очистки при разведении в 500 раз избирательно реагирует с гомологичным антигеном (TNF- α) в концентрациях менее 2.5 нг в образце (рис. 4), что свидетельствует о высокой аффинности полученных антител.

Ренатурация TNF- α . В литературе описана экспрессия TNF- α человека, а также его ренатурация из телец включения в лабораторных и полупромышленных условиях [11]. Поэтому в рамках нашего эксперимента по ренатурации он рассматривался в качестве модельного объекта, позволяющего отработать универсальную схему, приложимую к исследованиям широкого диапа-

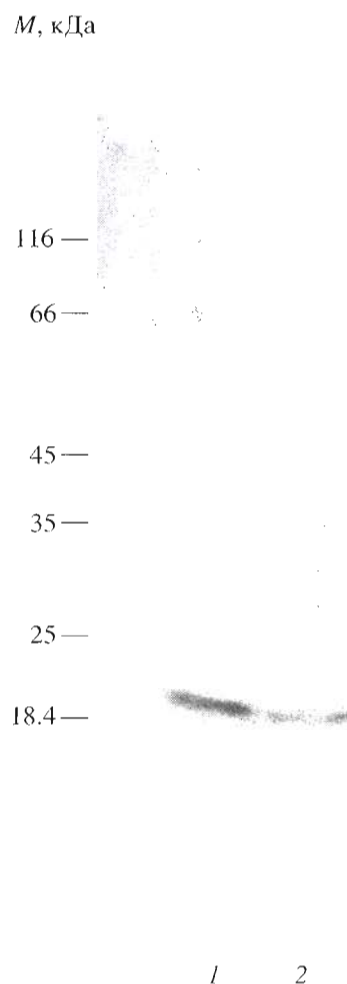


Рис. 4. Иммуноблоттинг ренатурированного TNF- α . На дорожки нанесен ренатурированный продукт конструкции rTNF5 в количествах 25 (1) и 2.5 нг общего белка (2).

зона новых белков с неизвестной функцией. Исходя из этого, при разработке общей схемы ренатурации белков не были использованы подходы, ранее положительно зарекомендовавшие себя применительно к TNF- α [11], а была выбрана методология, основанная на скрининге панели буферных растворов для ренатурации и тех свойствах белка, которые могут быть рассчитаны на основании лишь известной аминокислотной последовательности. Из рассмотрения были исключены методы гель-фильтрации, диализа и другие, ограничивающие возможность широкого варьирования состава буферов или требующие значительных количеств обрабатываемого белка, поскольку и первое, и второе нежелательно на начальных этапах отработки методики.

В работе [8] предложен экспресс-протокол, включающий одноступенчатое разбавление аликвот телец включения, солюбилизованных в растворе хаотропного агента, одним из 15 различных

Состав буферов с pH 8.0, использованных для ренатурации TNF- α – продукта конструкции pTNF5

Номер буфера	Компоненты и их концентрации								
	Трис-НСl, мМ	NaCl, мМ	KCl, мМ	MgCl ₂ , мМ	CaCl ₂ , мМ	сахароза, М	EDTA, мМ	Тритон X-100, %	ПЭГ 4000, %
1	50	9.6	0.4	2	2	0.1	–	0.5	0.05
2	50	9.6	0.4	2	2	–	1	–	0.05
3	50	9.6	0.4	2	2	0.1	–	0.5	–
4	50	9.6	0.4	2	2	–	1	0.5	0.05
5	50	240	10	–	–	–	1	–	0.05
6	50	240	10	–	–	–	1	0.5	–
7	50	240	10	2	2	0.1	–	0.5	0.05
8	50	240	10	2	2	0.1	–	–	–

буферных растворов, входящих в панель. При этом в применении к конкретному белку часть панели может быть исключена из эксперимента путем сопоставления pH буферных растворов с *pI* белка, подлежащего ренатурации: предполагается,

что в растворе со значением pH, близким к *pI* белка, он менее склонен к формированию агрегатов за счет ионных взаимодействий [8]. С помощью пакета программ “DNA STAR” была рассчитана *pI* денатурированного TNF- α человека, составившая 7.28. С учетом этого результата из полной панели [8] были отобраны только буферные растворы со щелочными значениями pH (таблица).

В ходе эксперимента было установлено (рис. 5), что ренатурация TNF- α человека эффективно идет лишь в буферных растворах с высокой ионной силой (240 мМ NaCl и 10 мМ KCl), в остальных буферах основная масса белка агрегировала и удалялась из раствора при центрифугировании. Буферный раствор № 6, обеспечивший наилучший результат (дорожка 8), содержал 240 мМ NaCl, 10 мМ KCl и 0.5% Тритон X-100 и EDTA (таблица). В то же время высокая ионная сила буфера не является достаточным условием хорошего выхода ренатурации: так ионная сила буферных растворов 6 и 7 одинакова (см. материалы и методы), однако белок, ренатурированный в буфере 7 (дорожка 9), нестабилен при хранении в течение 7 сут при 4°C, подвергаясь протеолизу (рис. 5).

При объяснении причины разной эффективности ренатурации TNF- α в различных условиях, необходимо учитывать, что нативный TNF- α находится в растворе в форме тримера, что характерно для всех лигандов и рецепторов семейства TNF/TNF-R [12]. Показана также возможность аномального фолдинга TNF- α , приводящего к формированию димерных молекул вместо тримерных. Такой белок стабилен в растворе лишь непродолжительное время и не способен к спонтанному переходу в истинно нативную конформацию [13].

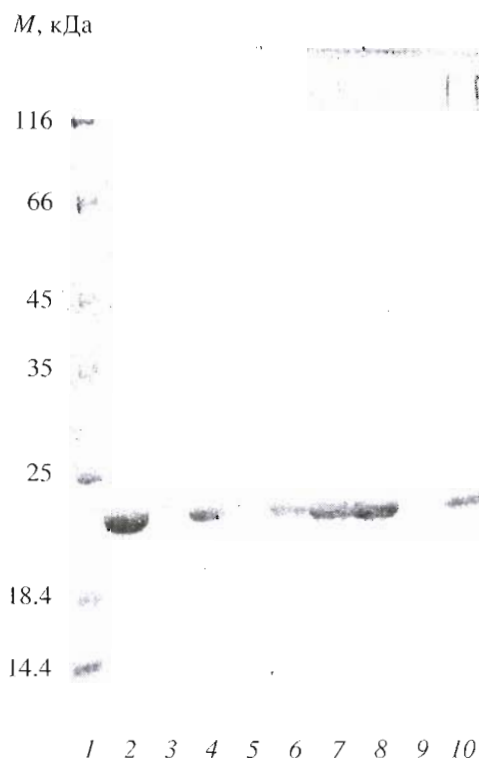


Рис. 5. Электрофорез в 12.5% SDS-ПААГ TNF- α до и после ренатурации. (1) – стандарт молекулярной массы; (2) – белок в виде телец включения до процедуры рефолдинга; (3–10) – белок, оставшийся в растворе после ренатурации 2.5 мкг (по общему белку) солубилизованного материала телец включения в присутствии буферов 1–8 (таблица). Для электрофореза использовались образцы после хранения в течение 7 сут.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Геномную ДНК человека выделяли с помощью набора Wizard SV 96 Genomic DNA Purification system (Promega, США). Праймеры TNF-1,

TNF-2, TNF-3 и TNF-5 были сконструированы с использованием нуклеотидной последовательности гена TNF- α [NCBI M26331] (5' \rightarrow 3', жирным шрифтом выделены сайты действия рестриктаз)

TNF-1 (*Nde*I) **ggcatatgat**gcgcagcagcaggccgcaacccccgagcgataaa

TNF-2 cggcaccacatgggccaccggtttatcactcgggggtgc

TNF-3 (*Bam*HI) **gggatccc**gtaacccgcaggctgagggggcagctccagtg

TNF-5 (*Xba*I) **ggtctagagg**gcaataatcccaagtag

Для генно-инженерного конструирования на базе вектора pET23a (Novagen, США) в работе использовали штамм *E. coli* BMH 71-18 (*thi*, *supE*, *F' proAB*, *lacI^q ZAM15*) (Promega, США). Для проведения экспрессии под контролем промотора фага T7 служил штамм BL21(DE3) (*F*-, *ompT*, *hsd S^b(r^b-m^b-)*, *dcm*, *gal*, (DE3), *pLysS*, *Cm^r*).

Генно-инженерное конструирование. Процедуры молекулярного клонирования, выделения плазмидной ДНК, рестрикционный анализ проводили согласно методикам [14].

ПЦР с геномной ДНК человека и праймерами TNF-3 и TNF-5 осуществлялась на термоциклере Tercus MC-16 (ДНК-технология Россия). При проведении ПЦР использовали ДНК-полимеразу *Taq* (Бионем, Россия). Геномную ДНК-матрицу вносили в реакционную смесь до конечной концентрации 0.01 мкг/мл. ПЦР проводили в следующих условиях: 94°C – 1 мин, 54°C – 45 с, 72°C – 15 с, 30 циклов. Амплифицированный фрагмент ДНК разделяли электрофоретически в 1%-ном агарозном геле и элюировали с помощью набора Wizard DNA Clean-up system (Promega, США).

Праймер TNF-2 (3 пмоль) фосфорилировали с помощью полинуклеотидкиназы T4 (MBI Fermentas, Литва) по методике [15]. В работе использовали фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I (MBI Fermentas, Литва). Амплифицированный фрагмент, фланкированный праймерами TNF-3 и TNF-5, был линейаризован с помощью рестриктаз *Bam*HI и *Xba*I и клонирован в вектор pET23a, предварительно линейаризованный по тем же сайтам. Полученная при этом генная конструкция pTNF- α 1 использовалась в качестве промежуточной в ходе сборки полноразмерного варианта гена TNF- α человека. Фосфорилированный по 5'-концу праймер TNF-2 смешивали в эквимольных соотношениях с TNF-1 и достраивали фрагментом Кленова в присутствии всех четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (в концентрации 20 мкМ каждый) в течение 1 ч при температуре 37°C. Полученный при этом синтетический фрагмент размером 70 п. о. после осаждения изопропанолом был расщеплен рестриктазой *Nde*I и клонирован в описанную выше конструкцию pTNF- α 1, которая для этой цели расщеплялась по сайтам *Nde*I и *Hpa*I. При этом

получили генную конструкцию pTNF5, кодирующую полноразмерный ген TNF- α (фрагмент, кодирующий секреторный пептид, отсутствовал).

Получение и культивирование штаммов-продуцентов. Для культивирования бактерий использовали жидкую и агаризованную среду LB [14], содержащую ампициллин в концентрации 100 мг/л. Трансформацию *E. coli* проводили по протоколу [14]. Для получения инокулята для ферментации использовали отдельные колонии со свежих чашек, имеющие возраст не более 30 ч с момента трансформации. Культуру *E. coli* с момента высева трансформированных клеток на агаризованную среду LB, содержащую ампициллин, до окончания культивирования поддерживали при температуре 30°C.

В день начала эксперимента штамм BL21(DE3) трансформировали ДНК экспрессионных конструкций pTNF- α 1 и pTNF5. На следующий день образовавшиеся колонии трансформантов использовались для засева ночной культуры, которая достигала плотности $A_{610} = 1.5$ в ходе инкубации в течение 18 ч при интенсивном перемешивании при температуре 30°C. Такую культуру (6 мл) использовали для засева колбы, содержащей 30 мл жидкой среды LB с ампициллином в стандартной концентрации и 1 мМ IPTG. Далее культивирование проводили при интенсивном перемешивании в течение еще 8–10 ч.

Рекомбинантный TNF- α накапливался в клетках в виде нерастворимых телец включения. Немедленно по окончании ферментации выращенную биомассу собирали центрифугированием и промывали физиологическим раствором для удаления остатков среды. Клетки ресуспендировали в 40 мМ буфере Трис-HCl, pH 8.0.

Для разрушения клеточной стенки *E. coli* использовали лизоцим в концентрации 5 мкг/мл (Реахим, Россия). Лизис проводили при 4°C в течение 12–18 ч. Клетки дезинтегрировали с помощью ультразвукового диспергатора (Soniprep 150, MSE, Япония). Суспензию (для отделения телец включения от растворимых клеточных белков и геномной ДНК) центрифугировали при 4000 g в течение 20 мин. Собранную фракцию телец включения ресуспендировали в деионизированной

воде и вторично осаждали в тех же условиях. Процедуру ресуспендирования-центрифугирования повторяли 2–5 раз.

Уровень накопления рекомбинантного белка в тельцах включения контролировали, растворяя аликвоты осадка, собранного после процедуры центрифугирования, в денатурирующем буфере Лэммли (0.1 М Трис-НСl, рН 8.0, 8 М мочеви́на, 1% SDS, 5% β-меркаптоэтанол) с последующим электрофорезом проб в 12.5% SDS-ПААГ.

Иммунизация животных, получение и тестирование сыворотки против TNF-α человека. Иммунизацию двух крыс породы Wistar проводили подкожно 3 раза в течение 1 месяца в присутствии при первой иммунизации полного, а в двух последующих неполного адъюванта Фрейнда. Для однократного введения одному животному использовали суспензию 500 мкг рекомбинантного TNF-α в виде телец включения в суспензии в 300 мкл физиологического раствора. Кровь отбирали из хвостовой вены. Для дальнейшего анализа использовали цельную сыворотку, образовавшуюся после отделения естественного фибринового сгустка.

Денатурирующий электрофорез в 12.5% SDS-ПААГ и полусухой электроперенос белков на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C (Amersham, Англия) проводили как описано в работе [6]. Мембраны с перенесенными белками блокировали в буфере PBS (20 мМ К-фосфат, рН 7.2, 120 мМ NaCl), содержащем 5% обезжиренного сухого молока. Цельную иммунную крысиную сыворотку инкубировали с фильтром в разведении 1 : 500. После трехкратной отмывки мембрану инкубировали с конъюгатом пероксидазы хрена и Ig мыши (ИМТЕК, Россия) в разведении 1 : 1000. Визуализацию проводили в буфере PBS с DAB в концентрации 1 мг/мл в присутствии 0.01% H₂O₂.

Ренатурацию рекомбинантного TNF-α проводили по принципу одноступенчатого разбавления солюбилизованных в хаотропном агенте телец включения. Согласно протоколу, предложенному в работе [8], была приготовлена панель буферных растворов (см. таблицу).

Концентрацию общего белка в суспензии телец включения определяли по модифицированному методу Лоури (нерастворимые в воде агрегаты предварительно растворяли в небольшом объеме 0.7 М NaOH, разбавляя затем стандартным раствором в 10 раз) [16].

Суспензию телец включения (50 мкл), содержащую 250 мкг общего белка, растворяли в 0.5 мл раствора 6 М гуанидингидрохлорида без добавления восстановителя, нерастворимый остаток удаляли центрифугированием на настольной центрифуге (Erpendorf, Германия) при 8000 g в течение 30 мин.

Аликвоту раствора солюбилизованных телец включения объемом 50 мкл при комнатной температуре добавляли к 950 мкл одного из

буферных растворов для ренатурации (таблица). Разбавленные растворы инкубировали в течение 18 ч при 4°C, после чего отделяли агрегировавший белок центрифугированием на настольной центрифуге при 8000 g в течение 30 мин. Из оставшегося в растворе белка отбирали аликвоты, которые осаждали 10% ТХУ и анализировали с помощью SDS-ПААГ на содержание целевого продукта: белка с молекулярной массой 21 кДа. Концентрацию общего белка, оставшегося в растворе после отделения агрегатов, определяли по методу Лоури [13]. Вычисляя выход ренатурации, исходили из допущения, что весь белок, оставшийся в растворе после отделения агрегатов, находится в нативной конформации.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность А.А. Криницыной (Ин-т биохимии им. А.Н. Баха РАН) за предложенную схему ренатурации белка и Е.Е. Куликову (Ин-т микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН) за помощь в подготовке рукописи.

Работа частично поддержана грантами РФФИ № 04-04-48693, 04-04-48694 и 03-04-48433.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pennica D., Nedwin G., Hayflick J., Seeburg P., Derynck R., Palladino M., Kohr W., Aggarwal B.B., Goeddel D.E. // Nature. 1984. V. 312. P. 724–729.
2. Bevilacqua M.P., Pober J.S., Majeau G.R., Fiers W., Cotran R.S., Gimbrone M.A., Jr. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 9238–9242.
3. Шингарова Л.Н., Сагайдак Л.Н., Турецкая П.Л., Недоспасов С.А., Есупов Д.С., Коробко В.Г. // Биоорг. химия. 1996. Т. 22. С. 243–253.
4. Шингарова Л.Н., Сагайдак Л.Н., Беркова Н.П., Коробко В.Г. // Биоорг. химия. 1997. Т. 23. С. 428–433.
5. Патрушев Л.И. Экспрессия генов. М.: Наука, 2000.
6. Sidhi R.S., Bollon A.P. // Anticancer Res. 1989. V. 9. P. 1569–1576.
7. Palmer I., Wingfield P.T. // Preparation and Extraction of Soluble (Insoluble-body) Proteins from *Escherichia coli*. Current Protocols in Protein Science / Eds Coligan J.E., Dunn B.M., Ploegh H.L., Speicher D.W., Wingfield P.T. New York: John Wiley and Sons, 1995. V. 1. P. 6.3.1–6.3.15.
8. Athenaes // Protein refolding manual: <http://www.athenaenvironmental.com/Refolding%20Kit%20Manual.pdf>.
9. Кэрролл С.Б., Логон А. Получение и очистка поликлональных антител к гетерологичным фрагментам гибридных белков, содержащих β-галактазидазу. В: Новое в клонировании ДНК. Методы. М.: Мир, 1989.
10. Hoelzle L.E., Hoelzle K., Wittenbrink M.M. // J. Vet. Med. 2003. V. 50. P. 383–389.

11. Калинин И.Т., Пустошилова Н.М., Денисов Л.А., Афанасьев С.С., Марченко В.И., Воробьев А.А., Рубальский О.В., Щербаков Г.И. // Вестн. Росс. акад. мед. наук. 1998. Т. 10. С. 29–32.
12. Schoenfeld H.J., Poeschl B., Frey J.R., Loetscher H., Hunziker W., Lustig A., Zulauf M. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 3863–3869.
13. Merli S., Corti A., Cassani G. // *Analyt. Biochem.* 1995. V. 230. P. 85–91.
14. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor; New York; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
15. Harrison B., Zimmerman S.B. // *Analyt. Biochem.* 1986. V. 158. P. 307–315.
16. Гурвич А.Е. Получение чистых антител и определение абсолютных количеств антител в сыворотках при помощи антигенов, фиксированных на целлюлозе. В: *Современные методы в биохимии*. М.: Медицина, 1964.

A New *Escherichia coli* Strain Producing Human Tumor Necrosis Factor

E. V. Surovtseva*, T. V. Kuznetsova*, V. G. Khomenkov*,
S. P. Domogatskii**, and A. B. Shevelev*#

Phone: +7 (095) 954-3066; e-mail: shevelev@inbi.ras.ru

*Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
Leninskii pr. 33 building 2, Moscow, 119071 Russia

**Myasnikov Cardiology Center, Moscow

An *Escherichia coli* strain producing human tumor necrosis factor (TNF- α) was obtained using a semisynthetic gene partially optimized in respect of codon composition and a phage T7 promoter. The expression product was accumulated in cells as inclusion bodies in a yield of 50–70 mg/l of culture medium. The recombinant TNF- α in the form of inclusion bodies was used for immunization of rats to give a polyclonal antiserum. The resulting antibodies were specific under the immunoblotting conditions to the antigen used for the immunization. A dilution-based refolding procedure was developed; it provided a yield of soluble protein exceeding 85%. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: human tumor necrosis factor (TNF- α), expression in *E. coli*; immunoblotting; renaturation