



УДК 577.214.622

© 1992 г. О. Г. Чахмахчева, Д. Фоти, И. Н. Паикова,
Н. Н. Полушин, В. А. Ефимов

СИНТЕЗ И ЭКСПРЕССИЯ В *ESCHERICHIA COLI* ГЕНА АЛЬБУМИНСВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА БЕЛКА G *STREPTOCOCCUS*

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

Осуществлен химико-ферментативный синтез гена, кодирующего альбуминсвязывающий фрагмент белка G стрептококков, который состоит из доменов A₂ и B₂ этого белка. На основе синтетического гена получены плазмиды, способные обеспечивать экспрессию этого фрагмента белка G в виде гибридного белка с иммуноглобулинсвязывающим доменом белка A стафилококков.

Ранее нами были описаны синтез гена иммуноглобулинсвязывающего фрагмента белка A стафилококков (SPA) и получение на его основе векторов, способных направлять экспрессию этого полипептида и его гибридных белков в межклеточное пространство [1]. Эти плазмиды были успешно использованы для экспрессии генов проинсулина человека [2], P26-кальцийсвязывающего белка фоторецепторных клеток сетчатки быка [3] и некоторых других полипептидов. Одно из преимуществ использования подобных экспрессирующих векторов заключается в возможности выделения целевых белков аффинной хроматографией.

Другой молекулой, которая обладает способностью связываться с иммуноглобулином G (IgG), является белок G стрептококков (SPG). Последний способен также связывать и сывороточный альбумин (SA) [4]. Известно, что SPG имеет несколько функционально различных частей: N-концевой сигнальный пептид (S); район, богатый остатками Ala (E); участки, ответственные за взаимодействие с альбумином и с IgG, которые представлены повторяющимися доменами (A, B) и (C, D) соответственно. C-Концевая часть содержит участки (W и M), ответственные за прикрепление к мембране и прохождение белка через клеточную стенку (см. схему). Было показано, что SA-связывающий район SPG или его фрагменты могут быть продуцированы в *E. coli* и использованы в качестве «аффинного хвоста» для очистки гибридных рекомбинантных белков [5, 6].

SPG	S	E	A ₁	B ₁	A ₂	B ₂	A ₃	C ₁	D ₁	C ₂	D ₂	C ₃	W	M
-----	---	---	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	---	---

В продолжение работ по конструированию векторов для получения гетерологичных пептидов и белков в бактериях нами были предприняты химико-ферментативный синтез и клонирование гена (*sspg*), кодирующего A₂B₂-повтор SA-связывающего домена белка G *Streptococcus* G418.

Последовательность полинуклеотида *sspg* длиной 238 п.о. была выведена на основании известной первичной структуры SPG [7] и генетического кода и составлена из кодонов, наиболее часто использующихся в генах *E. coli* (рис. 1). На ее 5'-конец вводился сайт эндонуклеазы рестрик-

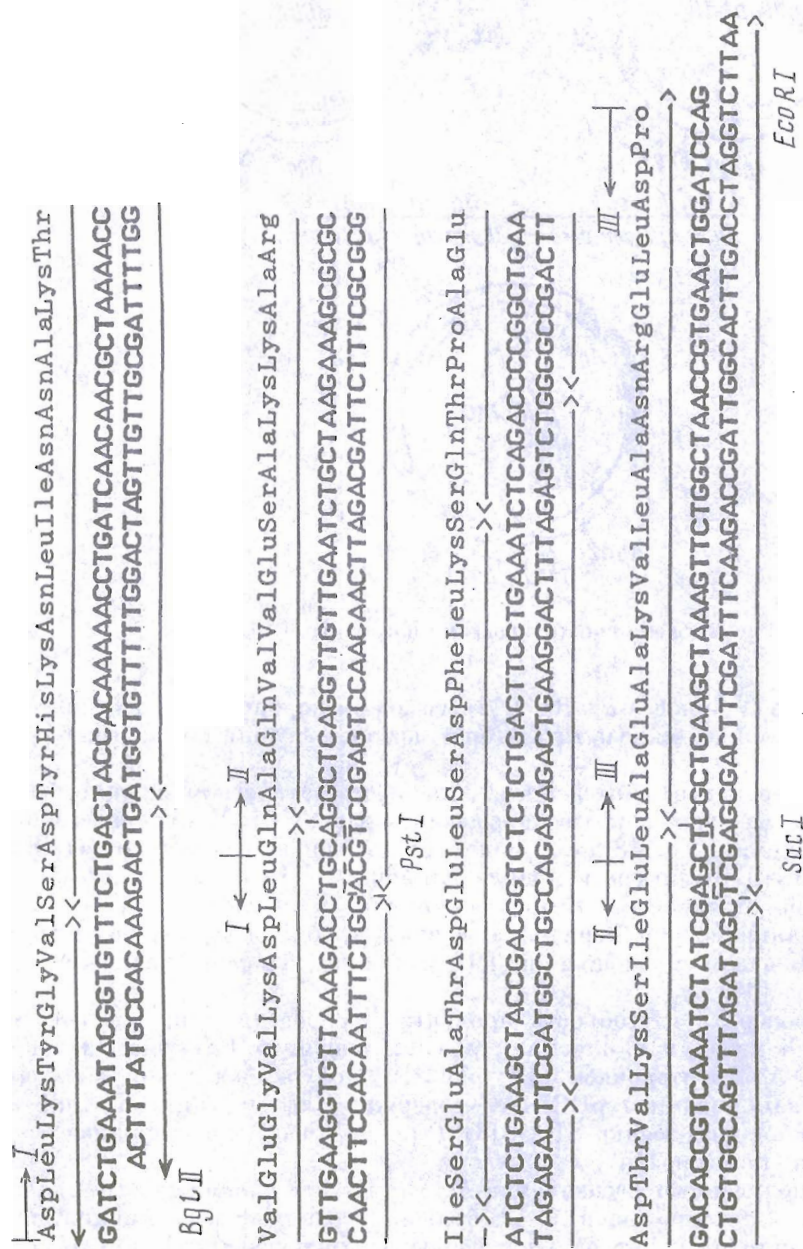


Рис. 1. Первичная структура искусственного гена *sspg* фрагмента A_2B_2 альбумина связывающего домена SPG и кодируемого им полипептида. Стрелками показаны олигонуклеотиды и модули (I-III), из которых составлялся фрагмент ДНК. Штриховой линией отмечены сайты расщепления эндонуклеазами рестрикции

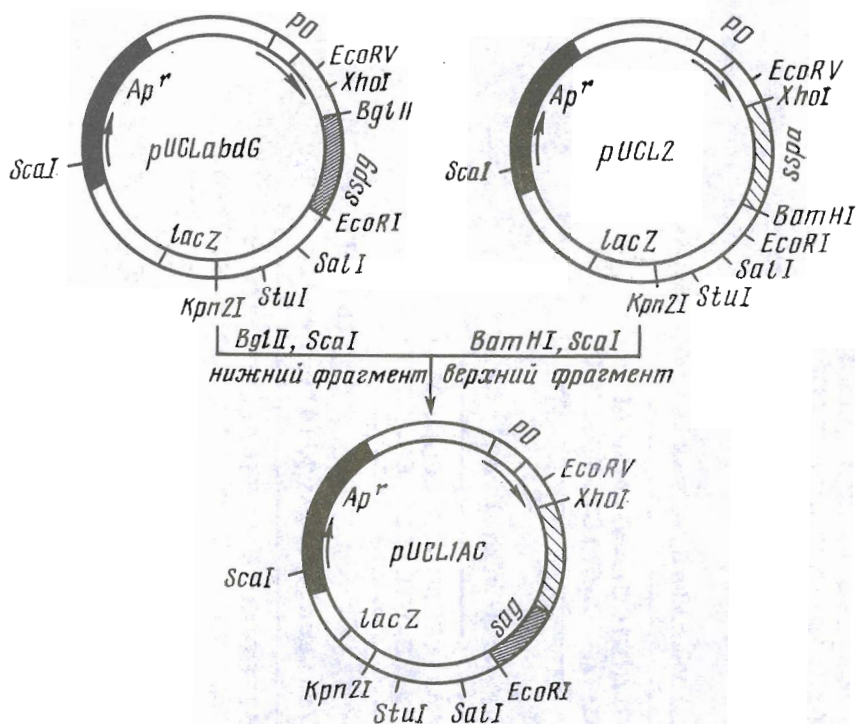


Рис. 2. Схема конструирования плазмиды pUCL1AC

ции *Bgl*II, а на 3'-конец — *Eco*RI. В то же время внутри гена были предусмотрены сайты эндонуклеаз *Pst*I и *Sac*I, которые делили его на три больших модуля.

Олигонуклеотидный синтез проводили в автоматическом режиме фосфоамидитным методом, как это описывалось ранее [8]. Полученные олигонуклеотиды длиной от 18 до 62 мономерных звеньев каждый сшивались с помощью Т4-ДНК-лигазы в модули длиной 80, 114 и 49 п.о., которые клонировались отдельно, а затем соединялись в плазмиде pUCL1 [1]. После окончания сборки первичную структуру гена *sspg* подтверждали методом химических модификаций [9], а также модифицированным методом Сенгера [10].

Чтобы проверить способность продукта экспрессии гена связывать альбумин, ген вводили в плазмиду pUCL2, несущую IgG-связывающий домен белка А стрептококков [1] (рис. 2). Полученная таким образом рекомбинантная плаزمида pUCL1AC содержала между сайтами *Xho*I и *Eco*RI ген гибридного белка SPA-SPG (*sag*, 713 п.о.), находящийся под контролем *lac*-промотора.

Штамм, полученный введением в *E. coli* HB101 плазмиды pUCL1AC, выращивали в течение ночи в LB-бульоне, содержащем ампициллин. Клетки отделяли от культуральной среды центрифугированием и разрушали обработкой ультразвуком. После отделения клеточного дебриса центрифугированием культуральную среду и второй супернатант делили на две равные части, одну из которых пропускали через колонку с IgG-сефарозой (Pharmacia, Швеция), а вторую — через колонку с альбумин-сефарозой, полученной по методу [11]. После промывки связавшиеся белки элюировали с колонок при пониженном pH. Элюаты белков анализи-

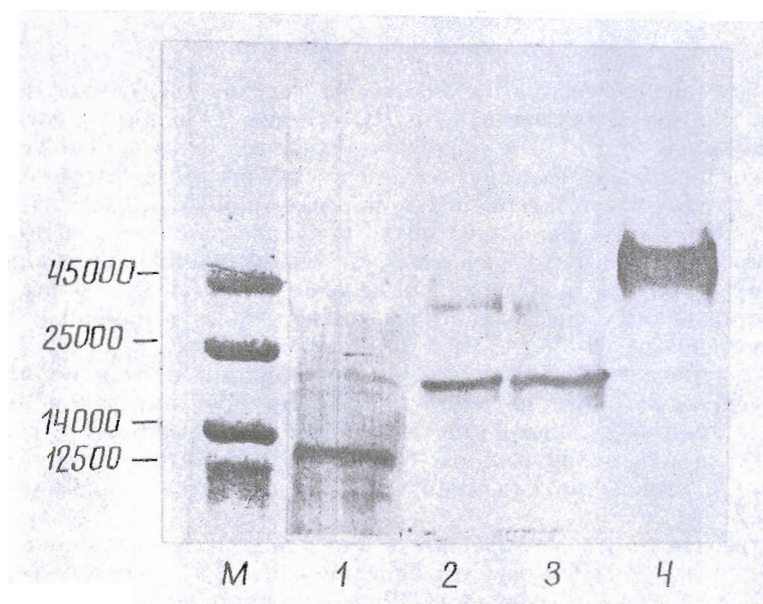


Рис. 3. Электрофорез продуктов экспрессии штаммов *E. coli* HB101/pUCL1AG (2, 3) и HB101/pUCL2 (1) в 15% полиакриламидном геле, содержащем SDS, после пропускания культуральной среды, отделенной от клеток *E. coli*, через колонку с IgG-сефарозой (1, 2) или альбумин-сефарозой (3). В качестве свидетеля использовался альбумин (4). М – белки-маркеры, указана мол. масса

ровали электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии SDS (рис. 3). Мы нашли, что обе части гибридного рекомбинантного белка сохранили связывающую активность: SPA-часть – к IgG и SPG-часть – к альбумину. Продукт экспрессии был обнаружен как в клетках, так и в межклеточном пространстве. Таким образом, было показано, что гибридный белок обладает двойной аффинностью, причем для эффективного связывания с альбумином оказалось достаточно фрагмента A_2B_2 белка G, и он вполне может быть использован в качестве альтернативы IgG-рецептору белка A при очистке гибридных белков.

Следует отметить, что использование взаимодействия SPG – альбумин может иметь некоторые преимущества по сравнению с применением для тех же целей системы SPA – IgG [12]. В частности, альбумин является мономерным лигандом, в то время как IgG представляет собой тетрамер, что в случае его использования повышает возможность «утечки» с аффинной колонки не связанных с ней боковых цепей лиганда и усложняет картину элюции. Кроме того, поскольку гибридные белки часто детектируются с помощью различных иммунологических методов, альбуминсвязывающий домен белка G также имеет преимущество перед IgG-связывающими доменами, так как не дает неспецифического взаимодействия с антителами [6]. С другой стороны, как было показано ранее [12] и что согласуется с нашими предварительными экспериментами, альбуминсвязывающая часть белка G значительно менее стабильна в клетках *E. coli*, чем IgG-связывающий фрагмент белка A, и может подвергаться протеолизу. Поэтому работа с рекомбинантными белками, в состав которых входят фрагменты SPG, по-видимому, потребует специальных условий как на стадии выращивания биомассы, так и при очистке белков.

Экспериментальная часть

В работе использованы эндонуклеазы рестрикции фирм Boehringer (ФРГ) и Pharmacia (Швеция), Т4-ДНК-лигаза, Т4-полинуклеотидкиназа и ДНК-полимераза I *E. coli* (фрагмент Кленова) фирмы Pharmacia.

Химический синтез олигонуклеотидов осуществлялся фосфоамидитным методом [8] на синтезаторе 381A фирмы Applied Biosystems (США). Синтетические олигонуклеотиды после удаления защитных групп очищали препаративным электрофорезом в денатурирующем полиакриламидном геле, и их структуры подтверждали методом Максама — Гилберта [9]. 5'-Фосфорилирование олигонуклеотидов осуществляли с помощью Т4-полинуклеотидкиназы и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (>3000 Ки/ммоль).

Расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции и реакции лигирования проводили как описано ранее [1]. Конструирование рекомбинантных плазмид и трансформацию компетентных клеток *E. coli* HB 101, а также скрининг колоний гибридизацией с мечеными синтетическими олигонуклеотидами и выделение плазмидных ДНК осуществляли согласно работам [1, 2].

Электрофорез белков проводили в пластинах 15% полиакриламидного геля, содержащего SDS, как это описано ранее [2]. Альбумин-сефарозу получали из бромциан-сефарозы (Pharmacia) как это описано в работе [11]. Хроматографию на колонке с иммуноглобулин-сефарозе (Pharmacia) проводили по прилагающейся стандартной прописи, а хроматографию на альбумин-сефарозе — по методу [11].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ефимов В. А., Бураков А. А., Полушин Н. Н., Пашкова И. Н., Дмитрикова Е. В., Чухмаччева О. Г. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 4. С. 499–507.
2. Ефимов В. А., Алексюк И. В., Буракова А. А., Пашкова И. Н., Скиба Н. П., Чухмаччева О. Г. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 8. С. 1078–1090.
3. Кутузов М. А., Шмуклер Б. Е., Суслов О. Н., Заргаев А. А., Абдулаев Н. Г. // Биоорг. химия. 1992. Т. 18. № 5. С. 623–634.
4. Akerstrom B., Nielsen E., Bjorck L. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. № 228. P. 13388–13391.
5. Jansson B., Palmcrantz C., Uhlen M., Nilsson B. // Protein Engineering. 1989. V. 2. № 6. P. 555–561.
6. Abrahmsen L., Nygren P.-A., Uhlen M. // ICSU Short Reports, Advances in Gene Technology. 1988. V. 8. P. 126.
7. Olsson A., Eliasson M., Guss B., Nilsson B., Hellman U., Lindberg M., Uhlen M. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 168. № 2. P. 319–324.
8. Полушин Н. Н., Пашкова И. Н., Ефимов В. А. // Биоорг. химия. 1991. Т. 17. № 8. С. 1145–1148.
9. Mazam A. M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499–560.
10. Tabor S., Richardson C. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 14. P. 4767–4771.
11. Azen R., Porath J., Ernback S. // Nature. 1967. V. 214. № 5095. P. 1302–1306.
12. Nygren P.-A., Eliasson M., Abrahmsen L., Uhlen M. // J. Mol. Recognition. 1988. V. 1. № 2. P. 69–74.

Поступила в редакцию
12.11.1992

O. G. CHAKHMAKHCHEVA, D. FOTI, I. N. PASHKOVA, N. N. POLUSHIN,
V. A. EFIMOV

SYNTHESIS AND EXPRESSION OF A GENE FOR ALBUMIN-BINDING DOMAIN OF PROTEIN G FROM STREPTOCOCCUS

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

The chemical-enzymatic synthesis of a gene coding for A₂B₂ repeats of the albumin-binding domain of streptococcal protein G has been accomplished. The codon usage of the natural gene has been modified to adapt an artificial sequence for the efficient translation in *E. coli*. The gene (238 b.p.) was cloned in the polylinker plasmid pUCL1 and then fused in frame to the 3'-terminus of the gene for the IgG-binding domain of staphylococcal protein A, which was earlier cloned in the expression plasmid pUCL2. A fused polypeptide composed of the E and B domains of protein A and A₂B₂ repeats of protein G was produced in *E. coli* cells under the *lac* promoter control. The resulted product was isolated by affinity chromatography on IgG-sepharose and (or) albumin-sepharose.