



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.213

© 1993 К. Р. Бирих, Е. Н. Лебеденко,
Ю. А. Берлин

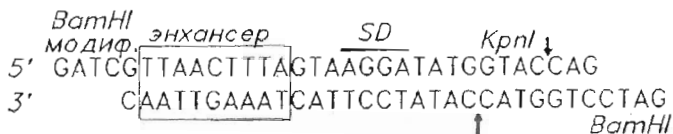
ПЛАЗМИДНЫЙ ВЕКТОР, СОДЕРЖАЩИЙ ЭНХАНСЕР ТРАНСЛЯЦИИ,
ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ
ДВУЦИСТРОННОЙ СИСТЕМЕ

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Ключевые слова: энхансер трансляции; интерлейкин-1 α ; экспрессия искусственных генов.

Один из наиболее распространенных подходов к синтезу эукариотических белков состоит в конструировании соответствующего безынтронного гена и введении его в бактериальный вектор, содержащий регуляторные элементы, необходимые для транскрипции гена и последующей трансляции синтезируемой мРНК. В настоящей работе ранее разработанный метод сплайсинга ДНК путем направленного лигирования (SDL) [1] использован при конструировании плазмидного вектора для экспрессии искусственных эукариотических генов на примере гена зрелого интерлейкина-1 α человека (IL-1 α), синтезированного этим же методом [1].

Попытки экспрессии синтетического гена IL-1 α в стандартном плазмидном векторе рGEM1 оказались безуспешными, возможно, из-за того, что при этом последовательность Шайна — Дальгарно (SD) в составе 5'-концевой не-транслируемой области соответствующего транскрипта оказывается целиком включенной в стебель возможной шпильки (рис. 1). Пытаясь обойти эту трудность, мы изменили структуру участка связывания рибосом в составе рGEM1, дополнив его еще одним регуляторным элементом — энхансером трансляции 5'TTAACTT-TA из лидерной мРНК гена 10 (g10l) бактериофага T7 [2]. Для этого по BamHI-сайту вектора рGEM1 был встроен синтетический 34-звенный дуплекс (I), содержащий энхансер, SD-последовательность AGGA и KpnI-сайт для последующего встраивания гена.



(I)

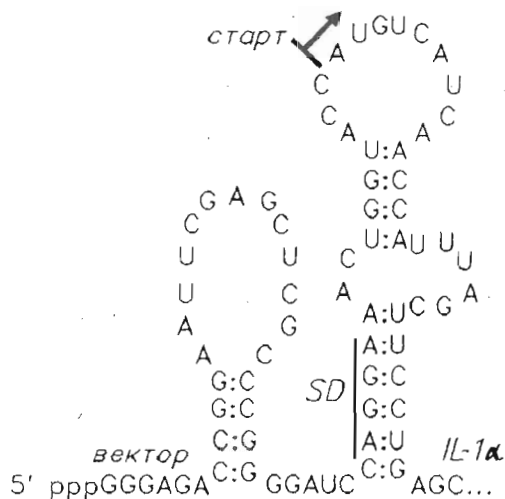


Рис. 1. Гипотетическая вторичная структура 5'-области транскрипта плазмиды рGEM1-IL1α с T7-промотора (здесь и далее рассчитано с помощью программы OLIGO)

Далее в полученный таким образом вектор рGEM1-ENH по *KpnI*, *BamHI*-сайтам был встроен ген *IL1-α*, в проксимальный конец которого предварительно, в составе праймера для полимеразной цепной реакции (ПЦР), также ввели *KpnI*-сайт; в результате была получена плаزمида рGEM1-ENH-IL1α. Как показывает анализ наиболее вероятной вторичной структуры ожидаемого транскрипта с T7-промотора (рис. 2), в области инициации трансляции он должен содержать шпильку, однако SD-последовательность и кодон ATG располагаются при этом в пределах одноцепочечных участков, так что вторичная структура мРНК оказывается благоприятной для инициации трансляции. Действительно, в штамме *E. coli* BL21 (DE3) [3], трансформированном плазмидой рGEM1-ENH-IL1α, в присутствии рифампицина целевой белок синтезировался; при этом, по данным денситометрии после прокрашивания белкового геля, его доля в суммарном белке в составе культурального лизата составила 15%.

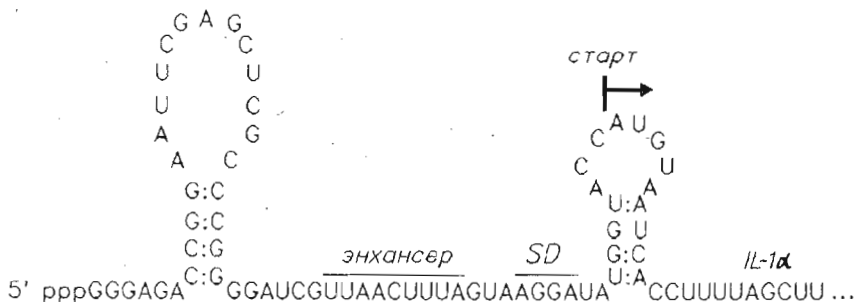


Рис. 2. 5'-Область транскрипта плазмиды рGEM1-ENH-IL1α с T7-промотора (ср. рис. 1)

Поскольку вторичная структура мРНК в области инициации трансляции и, следовательно, уровень трансляции в значительной мере определяются последовательностью проксимальной части экспрессируемого гена, эффективность конструкции такого рода может в широких пределах меняться от гена к гену. Чтобы

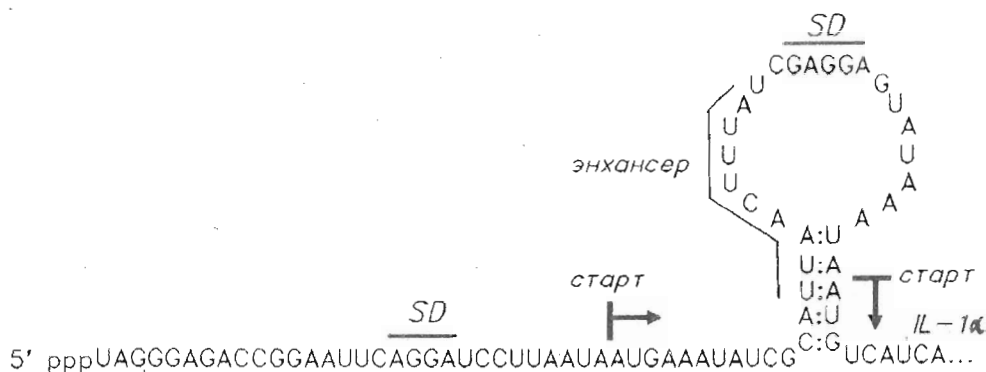
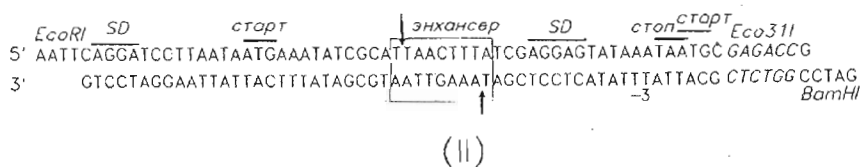


Рис. 3. 5'-Область транскрипта плазмиды pGEM1-MCENH-IL1α с T7-промотора (ср. рис. 1)

получить более универсальный вектор для эффективной экспрессии, мы использовали принцип сопряженной трансляции в составе двуцистронной конструкции [4]. Поскольку упоминавшийся выше энхансер, по-видимому, способен стимулировать трансляцию, находясь не только перед иницирующим кодоном, но и после него [2], мы решили поместить этот энхансер в кодирующую часть первого цистрона, рассчитывая на то, что в этой позиции он повысит эффективность инициации, трансляции обоих цистронов. Структура первого цистрона (вместе с иницирующим кодоном второго цистрона), собранного из четырех синтетических олигонуклеотидов и выделенного из ПААГ, представлена 67-звенным дуплексом (II) (стрелки показывают границы сегментов).



Его кодирующая часть, не привязанная к определенной аминокислотной последовательности, составлена (с учетом ряда данных об оптимизации трансляции) из наиболее часто встречающихся у *E. coli* [5] и, при прочих равных условиях, А/Т-богатых [6] триплетов. При этом она включает энхансер и SD-последовательность, сделанную октануклеотидным участком от иницирующего кодона второго цистрона, причем в области 5—6-го кодонов первого цистрона расположена последовательность ТТАА (ср. [7]), а в положении «-3» второго цистрона — звено А [7]. Нетранслируемая 5'-концевая область в составе этой последовательности представляет собой рибосомсвязывающий сайт из *lpp* мРНК *E. coli* [8]. Дистальная часть дуплекса (II) содержит частично перекрывающиеся терминирующий кодон первого цистрона и иницирующий кодон второго цистрона (ТААТГ-последовательность на стыке цистронов), что служит существенной предпосылкой эффективности сопряженной трансляции [9], и *Eco31I*-сайт для последующей стыковки со вторым цистроном с помощью SDE-метода [1].

Встраивание дуплекса (II) по *EcoRI*/*Bam*HI-сайтам плазмиды pGEM1 позволило получить универсальный экспрессирующий вектор pGEM1-MCENH для клонирования искусственных генов с образованием двуцистронной системы. В самом деле, в такой системе область инициации трансляции первого цистрона, которая в значительной степени определяет уровень трансляции целевого гена (второго цистрона), относительно автономна, т. е. ее вторичная структура не зависит от нуклеотидной последовательности этого гена и при этом несет все регуляторные элементы, необходимые для его эффективной трансляции.

Мы использовали этот вектор для клонирования и экспрессии гена IL-1 α человека, который из-за неблагоприятной вторичной структуры мРНК в области связывания рибосом не давал экспрессии в составе вектора рGEM1, но, как описано выше, экспрессировался в векторе рGEM1-ENH, т. е. рGEM1, модифицированном энхансером трансляции. В транскрипте двуцистронной конструкции рGEM1-МСЕНН-IL1 α сайт инициации трансляции первого цистрона доступен для посадки рибосом, а небольшая шпилька ($\Delta G = -1$ ккал/моль) (рис. 3), в которую включен иницирующий кодон второго цистрона, находится в транслируемой области первого цистрона и должна легко расплетаться рибосомой. Действительно, для плазмиды рGEM1-МСЕНН-IL1 α мы получили значительный уровень экспрессии целевого гена: доля IL-1 α в суммарном клеточном белке составила 27%, что больше, чем при использовании описанной выше одноцистронной конструкции рGEM1-ENH-IL1 α .

Таким образом, на основе плазмиды рGEM1 сконструирован универсальный вектор для экспрессии генов в составе двуцистронной системы сопряженной трансляции, и его эффективность показана на примере гена IL-1 α человека.

Авторы благодарны А. И. Гуревичу за обсуждение, И. В. Бони за критическое чтение рукописи и О. В. Плуталову за синтез олигонуклеотидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lebedenko E. N., Birikh K. R., Plutafov O. V., Berlin Yu. A. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. № 24. P. 6757—6761.
2. Olins P. O., Rangwala S. H. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 29. P. 16973—16976.
3. Studier F. W., Moffatt B. A. // J. Mol. Biol. 1986. V. 189. № 1. P. 113—130.
4. Schoner B. E., Belagaje R. M., Schoner R. G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 22. P. 8506—8510.
5. Maruyama T., Gojobori T., Aota S., Ikemura T. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. Suppl. P. 151—197.
6. de Boer H. A., Kastelein R. A. // Maximizing Gene Expression/Eds Reznikoff W., Gold L. Butterworths, 1986. P. 225—285.
7. Stromo G. D. // Maximizing Gene Expression/Eds Reznikoff W., Gold L. Butterworths, 1986. P. 195—224.
8. Nakamura K., Pirtle R. M., Pirtle I. L., Takeishi K., Inouye M. // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. № 1. P. 210—216.
9. Mashko S. V., Veiko V. P., Lapidus A. L., Lebedeva M. I., Mochulsky A. V., Shechter I. I., Trukhan M. E., Ratmanova K. I., Rebentish B. A., Kakuzhskiy V. E., Debabov V. G. // Gene. 1990. V. 88. № 1. P. 121—126.

Поступило в редакцию
30.VII.1993

*K. R. Birikh, E. N. Lebedenko,
Yu. A. Berlin*

**PLASMID VECTOR CONTAINING A TRANSLATION ENHANCER
FOR GENE EXPRESSION IN A PROKARYOTIC TWO-CISTRON
SYSTEM**

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow*

A versatile vector for prokaryotic gene expression in a two-cistron system of coupled translation has been constructed by modifying the pGEM1 vector, its use being exemplified by a gene for human interleukin 1 α .