



УДК 577.214.3

© 1994 Е. Н. Лебеденко, К. Р. Бирих,
М. Беккер, Ю. А. Берлин

СИНТЕЗ И ПРОКАРИОТИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА РЕЦЕПТОРНОГО АНТАГОНИСТА ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 ЧЕЛОВЕКА

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

Ключевые слова: рецепторный антагонист интерлейкина-1, кДНК-мРНК-дуплекс; ген, синтез и экспрессия; полимеразная цепная реакция.

С помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на дуплексе мРНК-кДНК в качестве матрицы синтезирован ген зрелого рецепторного антагониста интерлейкина-1 человека. Осуществлена эффективная экспрессия гена в составе бактериального вектора рGEM1.

Интерлейкин-1 (IL-1), объединяющий под этим названием два родственных полипептида — IL-1 α и IL-1 β , играет важную роль в организме человека и животных в качестве медиатора процессов нормального иммунного ответа, кроветворения, борьбы с инфекциями и вместе с тем в качестве одного из ключевых факторов развития и течения разнообразных патологических процессов, сопровождающихся воспалением, аутоиммунными реакциями или нарушениями кроветворения [2—4].

В круг биологических активностей IL-1 как в здоровом организме, так и при патологических процессах вовлечен еще один белок — рецепторный антагонист IL-1 (IL-1ra) [5]. Этот родственный IL-1 полипептид [6], обладая способностью связываться с его клеточными рецепторами, не проявляет никаких биологических свойств IL-1 и, таким образом, является его природным ингибитором. IL-1ra представляет большой интерес в качестве потенциального терапевтического средства, так как, обладая способностью ингибировать действие IL-1, он уменьшает тяжесть разнообразных заболеваний, сопровождающихся воспалением, таких, как ревматоидный артрит, вирусные и бактериальные инфекции, в том числе сепсис [3, 7—10].

Предварительное сообщение см. [1]. Префикс «d» (дезоксид) для краткости опущен всюду, кроме названий нуклеозидтрифосфатов; ПЦР — полимеразная цепная реакция; IPTG — изопропил- β -D-галактопиранозид; IL — интерлейкин; IL-1ra — рецепторный антагонист IL-1. Последний термин мы используем в качестве эквивалента английского термина «receptor antagonist» вместо обманчиво привлекательной кальки «антагонист рецептора» (в действительности это антагонист самого IL-1 и блокатор его рецептора).

Адрес для переписки: 117871, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ИБХ РАН, Ю. А. Берлину.

IL-1га интересен также в качестве удобной модели для изучения структурно-функциональных связей при взаимодействии рецептора IL-1 с лигандами и последующей трансдукции сигнала. Сравнительные исследования вторичной структуры IL-1 α , IL-1 β и IL-1га показали сходную укладку этих трех белковых молекул и позволили предложить молекулярную модель их связывания с рецептором [11—13]. Однако, несмотря на то, что работы в этом направлении ведутся очень интенсивно [14—16], механизм проявления биологической активности IL-1 после его присоединения к рецептору пока до конца не выяснен.

Цель настоящей работы — создание плазмидной конструкции, включающей ген антагониста и пригодной для направленного мутагенеза этого гена и его эффективной экспрессии в *E. coli*. Для этого мы сконструировали ген зрелого IL-1га человека с помощью ПЦР на дуплексе мРНК-кДНК в качестве матрицы; ранее аналогичный подход [17] мы использовали для синтеза гена IL-1 α [18].

Первичная структура антагониста была установлена независимо в двух лабораториях путем секвенирования кДНК из библиотеки моноцитов человека [5, 19]: он синтезируется в виде 177-звенного полипептида, который после отщепления 25-звенной N-концевой сигнальной последовательности и гликозилирования превращается в функционально активный гликопротеин со 152-звенным белковым компонентом. Негликозилированная форма белка также биологически активна [5, 20].

Располагая этой информацией, мы сконструировали праймер (I) (рис. 1), комплементарный 3'-концевому участку транскрибируемой части мРНК IL-1га — кодонам 147—152 и терминирующему кодону TAG (здесь и далее нумерация кодонов и аминокислотных остатков начинается от триплета CGA, кодирующего аргинин — N-концевой остаток зрелого IL-1га). Этот праймер способен избирательно инициировать обратную транскрипцию мРНК, кодирующей IL-1га, в составе многокомпонентной смеси полиаденилированных РНК из моноцитов человека.

Полученный в результате обратной транскрипции специфический гибридный дуплекс мРНК-кДНК служил матрицей в последующем раунде ПЦР. В качестве прямого праймера для этой реакции мы предполагали использовать 31-звенный нуклеотид (II) (рис. 1), содержащий наряду с 21-звенным 3'-концевым участком, идентичным 5'-концу значащей цепи гена IL-1га (кодоны 1—7), также дополнительную декануклеотидную последовательность CGGATCCATG, которая отвечает *VamHI*-сайту, фланкированному с 5'-конца звеном C, и инициирующему кодону ATG. В 28-звенном обратном праймере (III) (рис. 1) последовательность (I), комплементарная кодонам 147—152 и терминатору трансляции TAG и использовавшаяся нами для обратной транскрипции, была дополнена, как и в прямом праймере, 5'-фланкированным *VamHI*-сайтом CGGATCC. Использование праймеров (II) и (III) должно было привести к продукту амплификации, в котором структурный ген IL-1га фланкирован с обеих сторон *VamHI*-сайтами и наряду с нативным терминирующим кодоном TAG содержит инициирующий кодон ATG, непосредственно предшествующий началу гена зрелого антагониста.

Однако эта комбинация праймеров в ПЦР с гибридом мРНК-кДНК в качестве матрицы не дала нужного продукта амплификации даже в результате двух последовательных раундов ПЦР по 30 циклов каждый, хотя в общем случае праймеры со свисающими концами эффективны (см., например, [21]) и не раз использовались нами в работе [18]. Тогда в качестве альтернативного варианта в первом раунде ПЦР мы использовали праймеры, полностью комплементарные матрице: прямой праймер (IV) (рис. 1), составляющий 3'-концевую часть праймера (II) и, таким образом, полностью идентичный 5'-концу значащей цепи гена IL-1га, и обратный праймер (I), использовавшийся нами в реакции обратной транскрипции (см. выше). Хотя при электрофоретическом анализе реакционной смеси (после 40 циклов) с прокрашиванием бромистым этидием полоса нужного полинуклеотида не была обнаружена, при использовании аликвоты (1 : 10) этой реакционной смеси для еще одного раунда ПЦР (30 циклов) — на этот раз с

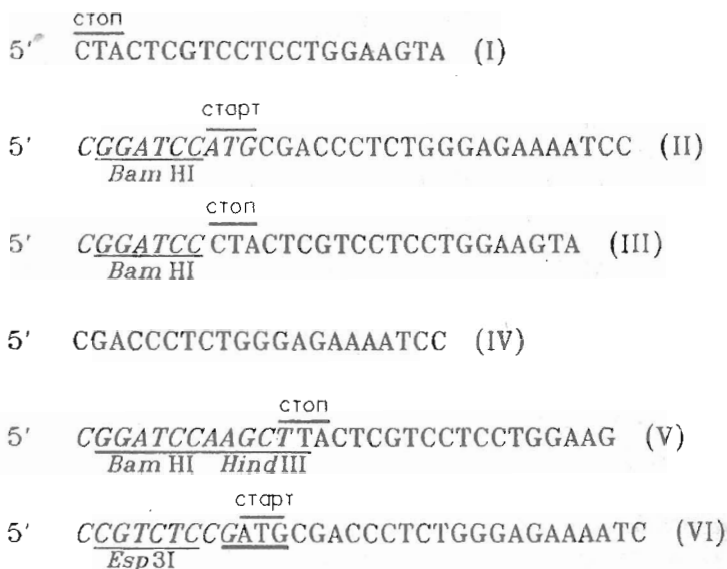


Рис. 1. Праймеры для амплификации *in vitro* гена IL-1 α . Подчеркнуты тонкой чертой участки узнавания эндонуклеаз рестрикции, жирной чертой — 5'-выступающий конец, образующийся при разрезании амплифицированной ДНК эндонуклеазой *Esp3I*. Отчеркнуты жирной чертой сверху иницирующий и терминирующий кодоны (как таковые или в виде комплементарной последовательности — в зависимости от того, составляют ли они часть прямого или обратного праймера). Свисающая (не комплементарная матрице) часть праймеров обозначена курсивом

праймерами (II) и (III) со свисающими концами — была идентифицирована полоса, отвечающая полинуклеотиду ожидаемого размера (476 п. о.).

Необходимость аналогичной двухэтапной ПЦР наблюдалась нами ранее при получении, исходя из геномной ДНК, одного из экзонов гена IL-1 α [22]. На основании этих наблюдений можно полагать, что при прочих равных условиях полностью комплементарные праймеры все же более эффективны в ПЦР, чем праймеры со свисающими концами; это не бросается в глаза, когда условия амплификации не слишком далеки от оптимальных, но может стать заметным в маргинальных ситуациях — например, если количество матрицы в реакционной смеси оказывается ниже некоторого определенного уровня.

После второго этапа ПЦР продукт амплификации гена IL-1 α был выделен электрофорезом в ПААГ и клонирован в вектор pUC19 по *SmaI*-сайту. В составе 24 проанализированных рекомбинантных клонов, несущих вставку ДНК ожидаемого размера, не было обнаружено вставок с нативной последовательностью гена IL-1 α — все они содержали несколько нуклеотидных замен, ведущих к молчащим или миссенс-мутациям, а также одну делецию (рис. 2).

В принципе причиной возникших замен могли быть как обратная транскриптаза RAV2 (Amersham), так и термостабильная ДНК-полимераза *Thermus thermophilus* (ЛИЯФ РАН, Гатчина), использовавшиеся нами в синтезе гена и не обладающие 3'-корректирующей активностью [23, 24]. Так, именно на счет обратной транскриптазы было отнесено несовпадение некоторых данных о структуре гена зрелого IL-1 α по данным анализа кДНК и геномной ДНК: при секвенировании кДНК для IL-1 α второе звено первого кодона зрелого белка было определено как С; в то же время анализ геномных клонов показал, что этим звеном является G, что соответствовало информации об N-концевой аминокислоте (Arg) зрелого IL-1 α [5].

С другой стороны, учитывая, что суммарное число циклов ПЦР, приведшее к гену антагониста в рамках настоящей работы, было весьма значительным, полученные замены можно было бы отнести на счет *Th*-полимеразы. Впрочем, ранее в опытах по основанному на ПЦР получению экзонных фрагментов гена

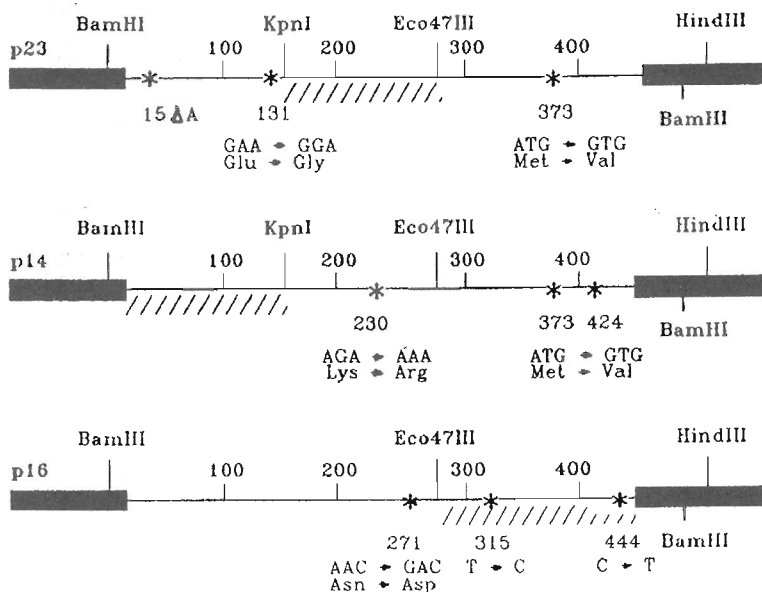


Рис. 2. Мутации (обозначены звездочками) в трех клонх (p23, p14, p16), несущих вставку синтетического гена IL-1ra (тонкая линия) в составе плазмиды pUC19 (жирная линия). Указаны нумерация нуклеотидов в последовательности гена (числа над линией), нуклеотидные замены (в том числе их положение — числа под линией) и соответствующие им замены аминокислот. Посредством двух рекомбинаций *in vitro* по отмеченным на схеме *KpnI/Eco47III*- и *Eco47III/HindIII*-сайтам была получена нуклеотидная последовательность, не содержащая миссенс-мутаций и кодирующая нативную аминокислотную последовательность зрелого IL-1ra. Заштрихованы участки плазмид, составившие в результате ген нативного зрелого IL-1ra

IL-1 α с помощью *Tth*-полимеразы с геномной ДНК в качестве матрицы, где обратная транскриптаза, естественно, не использовалась, мы обнаружили лишь один клон с единичной заменой в случае 6-го экзона, а в случае 5-го экзона даже при двухэтапной ПЦР с суммарным числом циклов 60 вообще не обнаружили клонов, несущих замены [22]. Таким образом, нельзя сказать с полной определенностью, какой из двух ферментов вносит основной вклад в появление мутаций, однако чаще всего ошибки в синтезе ДНК инкриминируются термо-стабильным ДНК-полимеразам.

Еще одним источником обнаруженных нами мутаций могли быть структурные дефекты использовавшихся праймеров (по крайней мере, в какой-то доле их молекул) — это касается делеции А в олигоаденилатном кластере (нуклеотиды 15—18) и замены С → Т в 148-м кодоне, расположенных в участках, отвечающих соответственно прямому и обратному праймерам. Это не означает, что речь идет о неправильных структурах в собственно химическом смысле слова, т. е. что в прямом праймере пропущено звено дезоксиаденозина, а в обратном праймере по ошибке оказался Т вместо С. В действительности оба праймера почти целиком состоят из молекул нужной структуры — иначе ни один из полученных клонов не содержал бы в соответствующих местах правильных звеньев. В то же время незначительная доля дефектных молекул в молекулярной популяции каждого из праймеров все же присутствует (в ходе работы обычно обнаруживаются лишь некоторые из этих дефектов) — это может быть связано с не вполне количественным протеканием кепирования при синтезе прямого праймера и с химической модификацией звена С при синтезе обратного праймера, вызывающей последующую ошибку при репликации. Такого рода погрешности — если их доля ниже некоторого определенного уровня — невозможно идентифицировать чисто химическими методами, и лишь почти сверхъестественная разрешающая способность метода молекулярного клонирования в сочетании с секвенированием позволяет это сделать.

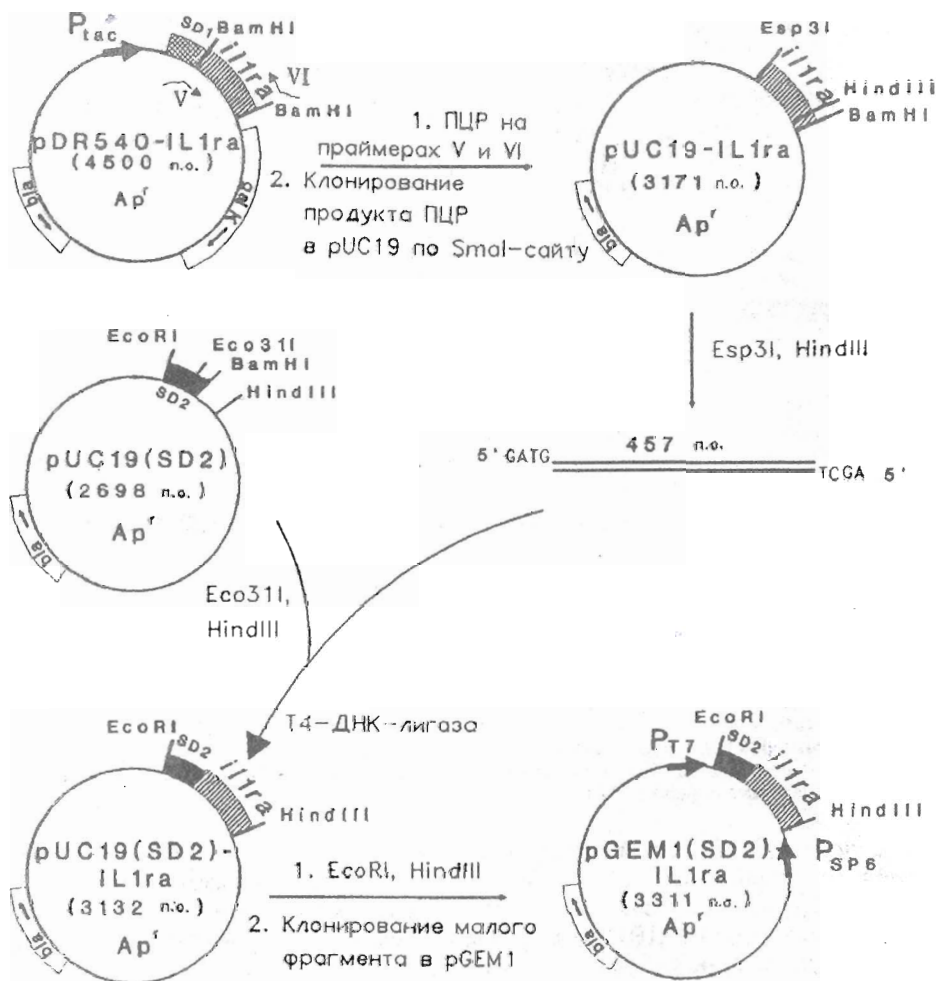


Рис. 3. Конструирование рекомбинантной плазмиды pGEM1 (SD2)-IL1ra для экспрессии гена IL-1ra

Чтобы из имевшихся мутантных плазмид получить ДНК, в которой последовательность триплетов в составе вставки в точности отвечает аминокислотной последовательности IL-1ra [5], мы использовали ДНК из трех клонов (p14, p16 и p23; рис. 2), несущие в совокупности четыре значащие мутации в различных частях гена. После замены *Eco47III/HindIII*-фрагмента в плазмиде p14 на соответствующий фрагмент плазмиды p16 мы получили промежуточную конструкцию (на рисунке не показана) с геном IL-1ra, в котором сохранилась единственная значащая мутация в положении 230. Затем из этой конструкции ген переклонировали по *BamHI*-сайту в не содержащий *KpnI*-сайта экспрессирующий вектор pDR540 и заменили в нем мутантный *KpnI/Eco47III*-фрагмент на соответствующий фрагмент плазмиды p23 (рис. 2). Эти две рекомбинации *in vitro* позволили устранить мутации, вызывающие аминокислотные замены, и привели к гену, хотя и сохранившему две молчащие мутации (транзиции T → C и C → T в третьем положении кодонов 105 и 148), но в точности кодирующему ранее описанную [5] 152-звенную последовательность зрелого IL-1ra.

Вектор pDR540 [25], лежащий в основе полученной нами конструкции pDR540-IL1ra (рис. 3), содержит структурные элементы, необходимые для транскрипции и трансляции целевого гена, — индуцируемый *tac*-промотор и последовательность Шайна — Дальгарно (SD). Однако ни в одном из штаммов *E. coli*, использовав-

кДа

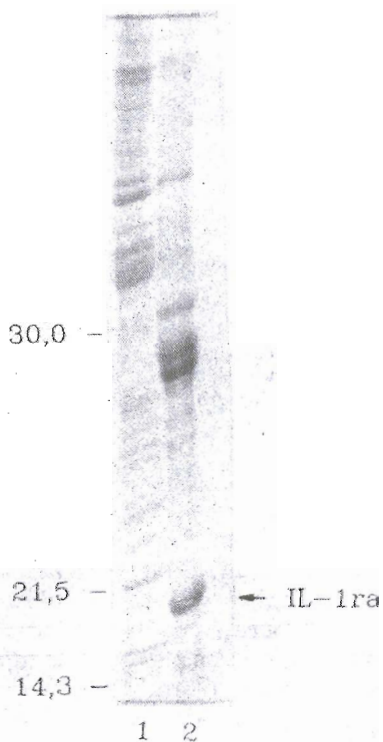


Рис. 6

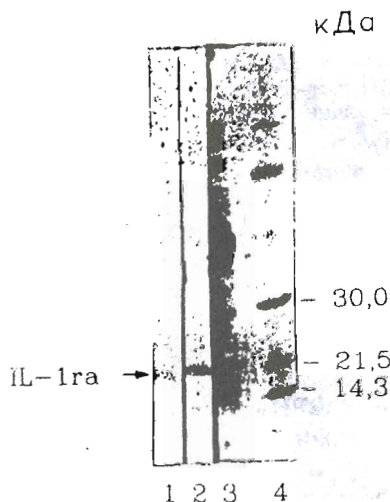


Рис. 7

Рис. 6. Электрофорез лизатов культуры *E. coli* BL21(DE3) с плазмидой pGEM1(SD2)-IL1ra в 15% ПААГ с 0,1% SDS. 1 — без индукции, 2 — индукция IPTG в течение 6 ч. Указаны положения стандартов молекулярных масс (Amersham, Rainbow Mid Range)

Рис. 7. Иммуноблоттинг белков лизата культуры *E. coli* BL21(DE3) с плазмидой pGEM1(SD2)-IL1ra (электрофорез по Лэмбли [35] в градиентном денатурирующем ПААГ (5–20%)). 1 — негативный контроль, 2 — иммуноблоттинг с поликлональными кроличьими антителами к IL-1 α , 3 — белки лизата, 4 — молекулярные маркеры (содержимое карманов 3 и 4 окрашено амидочерным)

доном — на три GC-пары меньше (при почти одинаковой длине), чем в конструкции на основе вектора pDR540 (рис. 4). В дуплексе введены выступающие *EcoRI*- и *BamHI*-концы для клонирования и *Eco31I*-сайт, ориентированный так, чтобы после расщепления этим ферментом образующийся 5'-выступающий конец (5' CATC), предназначенный для стыковки с геном антагониста, включал три-нуклеотид CAT, комплементарный иницирующему кодону этого гена.

Далее, используя метод сплайсинга ДНК путем направленного лигирования (SDL) [22], мы состыковали с этой последовательностью ген IL-1ra. Для этого с помощью ПЦР на гибридной плазмиде pDR540, содержащей ген IL-1ra (плазмида pDR540-IL1ra на рис. 3), и праймеров (V) (прямой) и (VI) (обратный) (рис. 1) мы получили амплифицированный ген IL-1ra, фланкированный с 3'-конца *BamHI*- и *HindIII*-сайтами, а с 5'-конца — *Esp31I*-сайтом, и клонировали его в промежуточный вектор pUC19 по *SmaI*-сайту (плазмида pUC19-IL1ra на рис. 3). При этом *Esp31I*-сайт ориентирован таким образом, чтобы при расщеплении этой

рестриктазой образующийся 5'-выступающий конец гена GATG, включающий иницирующий кодон (рис. 1), был комплементарен выступающему концу дуплекса (VII) (рис. 5) после его расщепления *Eco31I* (использование в данном случае рестриктазы *Esp3I* вместо *Eco31I* связано с наличием в гене IL-1ra *Eco31I*-сайта, что делает невозможным вырезание целого гена с помощью эндонуклеазы *Eco31I*). Ген IL-1ra вырезали из промежуточного вектора рестриктазами *Esp3I* и *HindIII* и состыковали с дуплексом (VII) в составе вектора pUC19, который предварительно расщепили рестриктазами *Eco31I* и *HindIII* (рис. 3).

В результате была получена рекомбинантная ДНК (плазмида pUC19(SD2)-IL1ra на рис. 3), в которой гену IL-1ra предшествует межцистронный участок *trpE-trpD* вместе с SD-последовательностью. Затем эта конструкция была переклонирована по *EcoRI*- и *HindIII*-сайтам в вектор pGEM1 под контроль промотора РНК-полимеразы фага T7 (плазмида pGEM1(SD2)-IL1ra на рис. 3).

При использовании в качестве хозяина для конструкции на основе вектора pGEM1 штамма *E. coli* BL21(DE3), в котором под контролем IPTG-индуцируемого *tac*-промотора синтезируется РНК-полимераза фага T7 [26], мы получили экспрессию гена IL-1ra. По результатам денатурирующего гель-электрофореза лизата биомассы после 3 ч индукции IPTG (рис. 6) продукт экспрессии имеет молекулярную массу около 17 кДа, что соответствует ожидаемому, и составляет 10—12% суммарного клеточного белка.

Не располагая антителами к IL-1ra, мы не могли идентифицировать его иммунохимически. Однако, учитывая сходную пространственную структуру и некоторую гомологию аминокислотных последовательностей IL-1ra и IL-1 α , мы провели иммуноблотинг продукта экспрессии гена IL-1ra с поликлональными антителами к IL-1 α . Оказалось, что эти антитела хорошо связываются с полученным нами продуктом экспрессии (рис. 7), свидетельствуя о его иммунологическом родстве с IL-1 α и тем самым — косвенно — подтверждая, что этот продукт является IL-1ra.

Экспериментальная часть

В работе использовали штаммы *E. coli* TG1 [31] и BL21(DE3) [26]; плазмидные векторы pUC19, pDR540 (Pharmacia) и pGEM1 (Promega); эндонуклеазы рестрикции *Eco31I*, *Esp3I*, *BamHI*, *SmaI*, *EcoRI*, *HindIII*, фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, полинуклеотидкиназу и ДНК-лигазу фага T4 (НПО «Фермент», Вильнюс), термостабильную ДНК-полимеразу *Thermus thermophilus* (ЛИЯФ, Гатчина), щелочную фосфатазу из кишечника теленка (CIP; Boehringer); [γ -³²P]гАТР и [α -³²P]дАТР (Обнинск), [α -³³P]дАТР (ИБХ РАН). Ферментативные реакции проводили в буферах, рекомендуемых фирмой-изготовителем, в том числе для рестриктазы *Eco31I* использовали буфер, содержащий 10 мМ трис-HCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl и 1 мМ дитиотреит, а для рестриктазы *Esp3I* — буфер, содержащий 33 мМ трис-ацетат (pH 7,9), 10 мМ Mg(OAc)₂, 66 мМ KOAc и 0,5 мМ дитиотреит.

Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса ([31], с. 1.25—1.28) и дополнительно очищали путем осаждения в 7,5% растворе полиэтиленгликоля 6000 ([31], с. 1.40—1.41).

Обратную транскрипцию проводили по методике [32]. Инкубационная смесь (20 мкл) содержала 1 мкг полиаденилированной мРНК из моноцитов человека (ВНИИОЧБ, С.-Петербург), 10 пмоль праймера (I), а также 20 ед. акт. обратной транскриптазы RAV (Amersham), буфер, Na-пирофосфат, человеческий плацентарный ингибитор РНКаз и смесь всех четырех dNTP из набора «cDNA Synthesis System Plus» (Amersham). После синтеза первой цепи кДНК (40 мин при 42° С) инкубационную смесь, содержащую дуплекс мРНК-кДНК, непосредственно использовали в последующей ПЦР.

Аmplификацию *in vitro* (ПЦР) проводили по модифицированной методике [33]. Инкубационная смесь (50 мкл) содержала в качестве матрицы 1/10 часть

инкубационной смеси с дуплексом мРНК-кДНК (см. предыдущий опыт), 67 мМ трис-НСl (рН 8,8), 6,7 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреит, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 8,5 мкг BSA, смесь четырех 1 мМ dNTP и по 10 пмоль 5'-фосфорилированных праймеров (I) и (IV). После денатурации (5 мин при 94° С) добавляли 2 ед. акт. Tth-ДНК-полимеразы и инкубировали в амплификаторе (Perkin-Elmer Cetus) 1 мин при 94° С (денатурация), 2 мин при 55° С (отжиг) и 3 мин при 72° С (элонгация) в течение 40 циклов. В случае двухэтапной амплификации второй раунд ПЦР при синтезе гена IL-1га на матрице мРНК-кДНК проводили с праймерами (II) и (III) в течение 30 циклов, используя в качестве матрицы 1/10 часть реакционной смеси, полученной с праймерами (I) и (IV). При модификации клонированного гена IL-1га проводили 30 циклов ПЦР в тех же условиях, используя в качестве матрицы 5 нг плазмидной ДНК, несущей ген. После окончания ПЦР в реакционную смесь добавляли NaCl до концентрации 5 мМ и 1 ед. акт. ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) и инкубировали еще 10 мин при 20° С для выравнивания концов продукта амплификации.

Клонирование продуктов амплификации и плазмидных фрагментов. Продукты ПЦР после выделения электрофорезом в 10% ПААГ с последующей электроэлюцией и гель-фильтрацией клонировали по тупым концам в векторе pUC19, расщепленном по единственному SmaI-сайту и дефосфорилированном щелочной фосфатазой по стандартной методике ([31], с. 1.60, 1.61, 5.72). Фрагменты плазмидной ДНК, содержащие ген IL-1га, извлекали расщеплением ДНК соответствующими рестриктазами и выделяли электрофорезом в 10% ПААГ (50 мМ трис-борат, рН 8,3; 1 мМ EDTA) с последующей электроэлюцией и гель-фильтрацией на сефадексе G-50. Векторы для клонирования по двум рестриктным сайтам (pUC19 или pGEM1) расщепляли соответствующими рестриктазами и малый фрагмент удаляли с помощью гель-фильтрации на сефакириле S-300 (Pharmacia) в TES-буфере (10 мМ трис-НСl, рН 8,0; 1 мМ EDTA; 0,2 М NaCl) с последующим обессоливанием большого фрагмента на сефадексе G-50 (Pharmacia). Лигирование и трансформацию компетентных клеток TG1 или BL21(DE3) проводили как описано ([31], с. 1.62, 1.70, 1.82—1.84), клоны, содержащие вставку, отбирали на селективных агаровых средах с ампициллином и X-gal (Sigma) ([31], с. 1.85, 1.86) или по результатам гибридизации.

Гибридизация колоний. Рекомбинантные клоны на основе плазмид pUC19(SD2) и pGEM1 анализировали посредством гибридизации бактериальных колоний на нитроцеллюлозных мембранах (0,45 мкм; Schleicher & Schuell) по описанной методике [31] (с. 1.90—1.104). В качестве зонда использовали 20-звенный олигонуклеотид 5' CATCTCCSTCCATGGATTC, комплементарный звеньям 176—195 гена IL-1га; зонд метили по 5'-концу с помощью [γ -³²P]гАТФ и T4-полинуклеотидкиназы ([31], с. 11.31—11.33).

Секвенирование плазмидной ДНК проводили методом дидезокситерминаторов Сенгера [34] с помощью модифицированной ДНК-полимеразы фага T7 и реактивов из «Набора для определения нуклеотидных последовательностей» (НПО «Фермент», Вильнюс), а также ряда специально синтезированных праймеров. Для секвенирования рекомбинантных плазмид pUC19 использовали 20-звенные праймеры, один из которых (5' GTTGTAACAACGACGGCCAGT) гомологичен смысловой (относительно вставки гена) цепи плазмиды в области, примыкающей к полилинкеру со стороны EcoRI-сайта, а другой (5' GCTATGACCATGATTACGCC) комплементарен той же цепи со стороны HindIII-сайта. Для секвенирования вставок в плазмиде pDR540 использовали 21-звенный праймер 5' АСААТТААТСАТСАТCGGСТС, гомологичный смысловой цепи в области tac-промотора. Секвенирование мест стыковки гена IL-1га с векторами проводили с внутренним 20-звенным праймером, использовавшимся также в качестве зонда (см. выше). Для секвенирования вставок в pGEM1 использовали 18-звенный праймер 5' ТААТАСГАСТСАСТАТАG, гомологичный значащей цепи плазмиды в области T7 промотора. Источником метки при

секвенирования служили [α - 32 P]dATP или [α - 33 P]dATP в составе смеси для элонгации.

Выращивание бактериальных культур, содержащих плазмиды, проводили в 1 мл среды LB с добавкой 0,2% глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина с аэрацией при 37° С. По достижении величины A_{600} 0,5 добавляли IPTG до концентрации 10^{-4} М, еще через 40 мин добавляли рифампицин (100 мкг/мл) и продолжали аэрацию 3—6 ч. Клетки отделяли центрифугированием, суспендировали в 100 мл буфера для лизиса (0,125 М трис-HCl, pH 6,8; 3% SDS; 0,4 М меркаптоэтанол; 20% глицерин; 0,2% бромфеноловый синий), обрабатывали ультразвуком в течение 3—5 с и 3 мкл аликвоты наносили на гель.

Электрофорез лизатов клеточных культур для выявления рекомбинантного белка проводили по методике [35] в 15% ПААГ с 0,1% SDS. Белки в гелях прокрашивали кумасси R-250 (Bio-Rad), гели после высушивания сканировали на спектрофотометре Gilford 2400-2.

Иммуноблоттинг белков проводили по методике [36]. После электрофореза клеточного лизата белки переносят на нитроцеллюлозную мембрану в приборе для полусухого переноса (LKB-Pharmacia) и обрабатывали кроличьими антителами к IL-1 α . Связанные антитела выявляли с помощью конъюгата пероксидазы хрена с вторичными антителами, используя в качестве хромогенного субстрата 3,3'-диаминобензидин (рис. 7).

Работа частично финансировалась грантом по программе «Новейшие методы биотехнологии».

Авторы благодарны О. В. Плуталову и А. Л. Каюшину за синтез олигонуклеотидов, Е. И. Шварцу и О. К. Кабоеву за ДНК-полимеразу *T. thermophilus*, А. С. Симбирцеву за поликлональные антитела к IL-1 α , Г. Ф. Пучковой за совместное проведение иммуноблоттинга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лебедево Е. Н., Берлин Ю. А. // Биоорг. химия. 1993. Т. 19. С. 586—588.
2. Dinarello C. A. // Blood. 1991. V. 77. P. 1627—1652.
3. Dinarello C. A. // Inf. Agents Dis. 1992. V. 1. P. 227—236.
4. Bagby G. C. // Blood. Rev. 1989. V. 3. P. 152—161.
5. Eisenberg S. P., Evans R. J., Arend W. P., Verderberg E., Brewer M. T., Hannum C. H., Thompson R. C. // Nature. 1990. V. 343. P. 341—346.
6. Eisenberg S. P., Brewer M. T., Verderber E., Heimdal P., Brandhuber B. J., Thompson R. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 5232—5236.
7. Dinarello C. A., Thompson R. C. // Immunol. Today. 1991. Y. 12. P. 404—410.
8. Ohlsson K., Bjork P., Bergensfeldt M., Hageman R., Thompson R. C. // Nature. 1990. V. 348. P. 550—552.
9. Gershenwald J. E., Fong Y. M., Fakey T. J., Calvano S. E., Chizzonite R., Killian P. L., Lowry S. F., Moldawer L. L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 4966—4970.
10. Bandara G., Mueller G. M., Gale-Lauri J., Tindal M. H., Georgescu H. I., Sushanek M. K., Hung G. L., Glorioso J. C., Robbins P. D., Evans C. H. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 10764—10768.
11. Graves B. J., Hatada M. H., Hendrickson W. A., Miller J. K., Madison V. S., Satow Y. // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 2679—2684.
12. Finzel B. C., Clancy L. L., Holland D. R., Muchmore S. W., Watenpaugh K. D., Einspahr H. // J. Mol. Biol. 1989. V. 209. P. 779—791.
13. Stockman B. J., Scallan T. A., Roy M., Ubrich E. L., Strakalajitis N. A., Erwiner D. P., Yen A. W., Deibel M. R. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 5237—5245.
14. Auron P. E., Quigley G. J., Rossenwasser L. J., Gehrke L. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 6632—6638.
15. Yanofsky S. D., Zurawsky G. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 13000—13006.
16. Ju G., Labriola-Tompkins E., Campen C. A., Benjamin W. R., Karas J., Plocinski J., Bianchi D., Kaffke K. L., Killian P. L., Eisenberg S. P., Evans R. J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 2658—2662.

17. Brenner C. A., Tam A. W., Nelson P. A., Engleman E. G., Suzuki N., Fry K. E., Larrick J. W.// *BioTechniques*. 1989. V. 7. P. 1096—1103.
18. Лебеде́нко Е. Н., Плуталов О. В., Берлин Ю. А.// *Биооргани. химия*. 1990. Т. 16. С. 1570—1573.
19. Carter D. B., Deibel M. R., Jr., Dunn C. J., Tomich C.-S. C., Laborde A. L., Slightom J. L., Berger A. E., Bienkowski M. J., Sun F. F., McEvan R. N., Harris P. K. W., Yem A. W., Waszak G. A., Chosay J. G., Sieu L. C., Hardee M. M., Zurcher-Neely H. A., Reardon I. M., Henrikson R. L., Truesdell S. E., Shelly L. A., Eessalu T. E., Taylor B. M., Tracey D. E.// *Nature*. 1990. V. 344. P. 633—637.
20. Arend W. P., Welgus R. C., Thompson R. C., Eisenberg S. P.// *J. Clin. Invest.* 1990. V. 85. P. 1694—1697.
21. Horton R. M., Hunt H. D., Ho S. N., Pullen J. K., Pease L. R.// *Gene*. 1989. V. 77. P. 61—68.
22. Lebedenko E. N., Birikh K. R., Plutalov O. V., Berlin Yu. A.// *Nucl. Acids Res.* 1991. V. 19. P. 6757—6761.
23. Gelfand D. H., White T. J.// *PCR Protocols/Eds Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J.* San Diego: Acad. Press, 1990. P. 129—141.
24. Verma I. M.// *The Enzymes/Ed Boyer P. D.* N. Y.: Acad. Press, 1981. V. XIV. P. 103.
25. de Boer H. A., Comstock L. J., Vasser H.// *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1983. V. 80. P. 21—25.
26. Studier F. W., Moffatt B. A.// *J. Mol. Biol.* 1986. V. 189. P. 113—130.
27. Бирух К. Р., Лебеде́нко Е. Н., Берлин Ю. А.// *Биооргани. химия*. 1993. Т. 19. С. 1234—1238.
28. Maximizing Gene Expression/Eds Reznikoff W., Gold L. Boston: Butterworths, 1986. P. 196—212.
29. Oppenheim D., Yanofsky C.// *Genetics*. 1980. V. 95. P. 785—795.
30. Mashko S. V., Veiko V. P., Lapidus A. L., Lebedeva M. I., Mochulsky A. V., Shechter I. I., Trukhan M. E., Ratmanova K. I., Rebutish B. A., Kaluzhsky V. E., Debabov V. G.// *Gene*. 1990. V. 99. P. 121—126.
31. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. P. A. 12.
32. Gubler U., Hoffman B. J.// *Gene*. 1983. V. 25. P. 263.
33. Kogan S. C., Doherty M., Gitschier J.// *New Engl. J. Med.* 1987. V. 317. P. 985—990.
34. Murphy G., Ward E. S.// *Nucleic Acids Sequencing: A Practical Approach/Eds Howe C. G., Ward E. S.* Oxford, New York, Tokyo: IRL Press at Oxford University Press, 1989. P. 99—115.
35. Laemmli U. K.// *Nature*. 1970. V. 227. P. 680—685.
36. Towbin H., Staehelin T., Gordon J.// *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1979. V. 76. P. 4350—4354.

Поступила в редакцию
26.III.1994

E. N. Lebedenko, K. R. Birikh, M. Becker, Yu. A. Berlin

SYNTHESIS AND PROKARYOTIC EXPRESSION OF A GENE ENCODING HUMAN INTERLEUKIN 1 RECEPTOR ANTAGONIST

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

Key words: interleukin 1 receptor antagonist; cDNA-mRNA duplex; gene, synthesis and expression; RT-PCR.

A gene coding for the interleukin 1 receptor antagonist has been synthesized by means of RT-PCR and expressed in a prokaryotic system.