



УДК 577.213.7;577.218

## ЭКСТРАКЛЕТОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА ЧЕЛОВЕКА (hEGF) В КЛЕТКАХ *Escherichia coli*

© 1999 г. Л. Р. Птицын<sup>#</sup>, И. Б. Альтман

Государственный научный центр РФ ГосНИИ "Генетика", 113545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1

Поступила в редакцию 11.02.99 г. Принята к печати 26.04.99 г.

Сконструирована экспрессионная плазмида рРТК-hEGF<sub>2</sub>, обеспечивающая экстраклеточную продукцию рекомбинантного эпидермального фактора роста человека (hEGF) в клетках *Escherichia coli*. Плазмида содержит две экспрессионные кассеты, одна из которых несет тандем слитых генов *ompF-hegf* под контролем промотора *tac*, что обеспечивает регулируемую секрецию hEGF в периплазму *E. coli*, а другая – ген *kil* плазмиды ColE1 под контролем промотора *lac*. Регулируемый слабый биосинтез белка Kil вызывает увеличение проницаемости внешней мембраны *E. coli* для периплазматических белков и, как следствие, "вытекание" в культуральную среду рекомбинантных белков, секретируемых в периплазму клеток. В результате штаммы *E. coli*, несущие данную плазмиду, эффективно продуцировали рекомбинантный hEGF в культуральную среду. Уровень продукции hEGF в штаммах TG1 (рРТК-hEGF<sub>2</sub>) и HB101 (рРТК-hEGF<sub>2</sub>) достигал 25–30 мг на 1 л культуры клеток через 14 и 18 ч культивирования, соответственно. Показано, что выделенный препарат hEGF обладает биологической активностью в тестах *in vitro* и *in vivo*.

**Ключевые слова:** эпидермальный фактор роста человека, hEGF, рекомбинантный; *kil* ген; *E. coli*, штамм-продуцент; экстраклеточная продукция, экскреция; очистка.

### ВВЕДЕНИЕ

Эпидермальный фактор роста человека (hEGF) – полипептид с молекулярной массой 6 кДа (53 а.о.), содержащий три дисульфидные связи, обладает рядом биологических активностей, связанных с эмбриональным ростом и регенерацией тканей [1, 2], и, в частности, играет ключевую роль в процессе регенерации эпителия роговицы глаза [3]. hEGF стимулирует рост клеток и их пролиферацию посредством высокоаффинного связывания со специфическим рецептором [4]. Показано, что hEGF ингибирует распад белка в клетках, имеющих рецепторы EGF [5]. Это ингибирование происходит уже при очень низких концентрациях и позволяет говорить об эффекте EGF, направленном на противодействие апоптозу.

Продукция рекомбинантного hEGF была получена с использованием целого ряда экспрессионных систем в клетках *E. coli* [6–9], *Bacillus subtilis* [10], дрожжах [11–13], *B. brevis* [14].

Как известно, hEGF в определенной степени подвержен деградации цитоплазматическими протеиназами *E. coli*, секреция же полипептида в периплазму клеток предотвращает его протеоли-

тическое расщепление [15]. Эффективная продукция ряда гетерологичных белков в *E. coli* была достигнута путем секреции их в периплазму клеток [15], однако, известно лишь несколько примеров эффективной экстраклеточной продукции рекомбинантных белков в *E. coli*.

Экскреция периплазматических растворимых белков в ряде случаев обеспечивается посредством биосинтеза определенного количества белка Kil, кодируемого геном *kil* плазмиды ColE1 [16, 17] или белка BRP (bacteriocin release protein), необходимого для экскреции бактериоцина из клеток, несущих плазмиду pCloDF13 [18]. При этом увеличивается проницаемость внешней мембраны клеток, и, как следствие, наблюдается "вытекание" в культуральную среду как периплазматических белков *E. coli*, так и рекомбинантных белков, секретируемых в периплазму клеток. Предполагается, что белок Kil опосредованно способствует деградации пептидогликановой оболочки, возможно, за счет активации фосфолипазы А, локализованной на внешней мембране клеток *E. coli* [19].

Например, с использованием вектора pEAR8 и его производных (плазмиды содержат ген *kil* под контролем пенициллазного промотора алкалофильных бактерий *Bacillus* sp.) была осуществлена экскреция гормона роста человека (hGH), фактора некроза опухолей (TNF- $\alpha$ ) и Fc-фрагмента иммуноглобулина IgG человека [20–22].

Сокращения: hEGF и *hegf* – эпидермальный фактор роста человека и его ген соответственно.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 314-18-58; e-mail: mashko@vnigen.msk.su).

Известно, что существенное повышение биосинтеза белка Kil или других бактериоциновых белков с аналогичными свойствами может приводить к лизису клеток, поэтому при конструировании экскреционных плазмид важен подбор уровня экспрессии гена *kil* в рекомбинантных штаммах. Так, авторы работы [20] использовали в векторе pEAP8 относительно слабый конститутивный пенициллазный промотор алкалофильных бактерий *Bacillus* sp. В работе [18] была применена система двух совместимых векторов, один из которых содержал гибридный ген *ompA-hGH* под контролем регулируемого гибридного промотора *lpp-lac*, а второй – низкокопийный вектор pJL3 с репликоном плазмиды pACYC184 – нес ген белка BRP плазмиды pCloDF13 под контролем той же регуляторной системы, что позволяло осуществить регулируемый биосинтез hGH в культуральную среду.

Следует отметить, что экскреция рекомбинантных белков в среду в процессе их микробиологического синтеза может давать ряд преимуществ при выделении и очистке этих продуктов.

В данной работе мы сконструировали вектор, содержащий две экспрессионные кассеты, одна из которых обеспечивала регулируемую секрецию hEGF в периплазму *E. coli*, а другая – регулируемый слабый биосинтез белка Kil, кодируемого фрагментом ДНК плазмиды ColE1. В результате, штаммы *E. coli*, несущие данную плазмиду, эффективно продуцировали рекомбинантный hEGF в культуральную среду.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее периплазматическая продукция hEGF была осуществлена при экспрессии гена *hegf*, слитого с геном лидерной последовательности белка OmpF *E. coli* под контролем промотора *tac* [9]. Уровень биосинтеза hEGF в штамме *E. coli* TG1, несущем плазмиду с двумя копиями слитого гена *ompF-hegf*, составлял около 10 мг рекомбинантного белка на 1 л культуры клеток, причем дальнейшее увеличение числа копий гена в экспрессионной плазмиде не увеличивало накопления hEGF в периплазме клеток, но сопровождалось частичной экскрецией синтезируемого hEGF (до 30%) в культуральную среду.

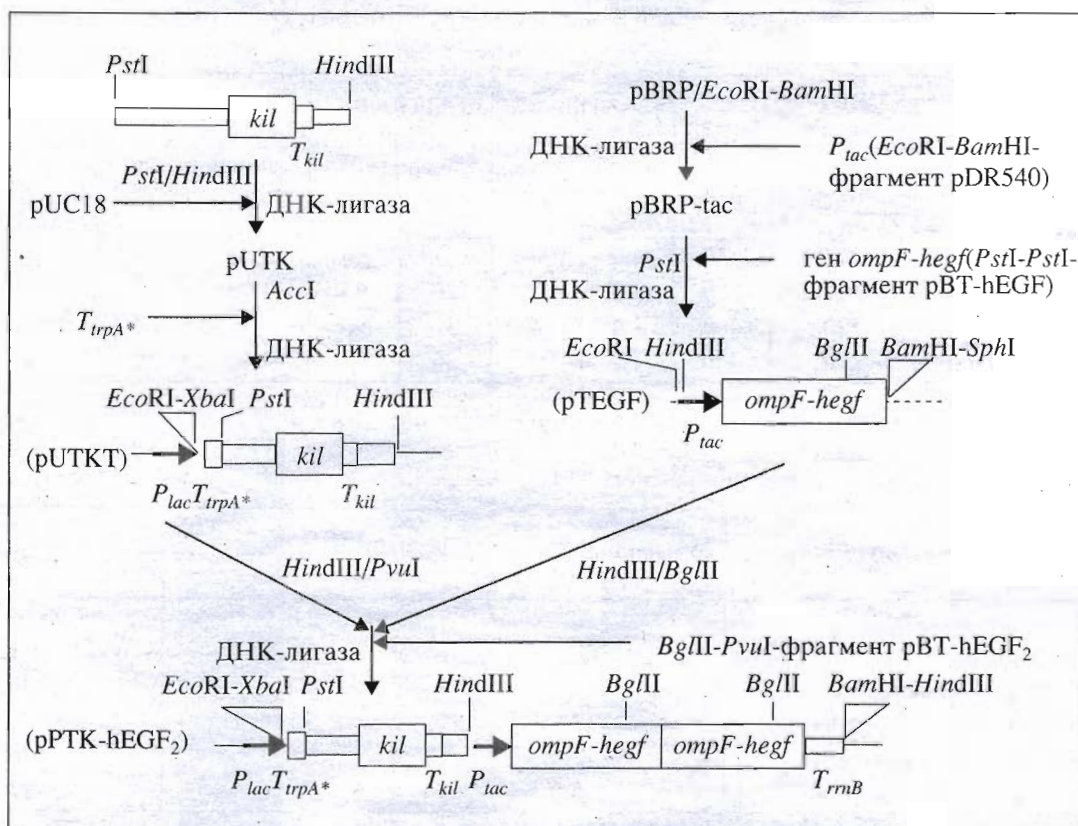
Поэтому мы сконструировали новую экспрессионную плазмиду, обеспечивающую эффективную регулируемую экскрецию hEGF за счет одновременной индукции биосинтеза рекомбинантного продукта и необходимого для секреции периплазматических белков в культуральную среду уровня биосинтеза белка Kil.

Фрагмент ДНК плазмиды ColE1 (0.67 т.п.о.), содержащий последовательность гена *kil* (0.14 т.п.о.) и р-независимый терминатор транскрипции по-

сле гена, посредством ряда генно-инженерных манипуляций (см. “Эксперимент. часть”) был клонирован в плазмиду pUC18 по сайтам узнавания рестриктаз *Pst*I и *Hind*III под контроль промотора *lac* (плазмиды pUTK, рис. 1). Однако уровень синтеза белка Kil в штамме TG1(pUTK) в условиях индукции промотора оказался слишком высоким, вследствие чего при культивировании клеток в присутствии 0.2 мМ изопропил-β-D-тиога-лактозида (IPTG) наблюдалось уменьшение оптического поглощения культуры и частичный лизис клеток, сопровождавшийся появлением цитоплазматических белков в культуральной среде (по данным SDS-электрофореза, данные не представлены). Для снижения уровня продукции Kil по сайту *Acc*I плазмиды pUTK был клонирован химически синтезированный модифицированный терминатор транскрипции  $T_{irpA}$  (31 п.о.) (плазмиды pUTKT, рис. 1). Как известно,  $T_{irpA}$  является сильным терминатором транскрипции (эффективность около 95%), поэтому для снижения “силы” терминатора обратный повтор, образующий в нем шпильку, был уменьшен на одно основание по сравнению с природным  $T_{irpA}$  ( $T_{irpA}^*$ ). Выращивание штамма TG1(pUTKT) в LB-среде в условиях депрессии промотора *lac* не приводило к заметному лизису клеток, но сопровождалось “вытеканием” белков периплазмы клеток в культуральную среду (данные не представлены). Вектор pUTKT далее был использован для конструирования экспрессионного вектора, обеспечивающего экскрецию hEGF в культуральную среду.

Плазмиды pPTK-hEGF<sub>2</sub> была получена при лигировании трех фрагментов: вектора pUTKT/*Hind*III-*Pvu*I; *Hind*III-*Bgl*II-фрагмента плазмиды pTEGF, содержащего часть экспрессионной кассеты “промотор *tac* – «слитый» ген *ompF-hegf*”, включающую 5'-концевую последовательность гена *hegf* (см. “Эксперимент. часть”); *Bgl*II-*Pvu*I-фрагмента плазмиды pVT-hEGF<sub>2</sub> [9], несущего последовательность 3'-концевой части *hegf*, вторую копию слитого гена *ompF-hegf* и терминатор транскрипции  $T_{rmB}$  (рис. 1). Сконструированная плазмиды содержала две экспрессионные кассеты, включающие ген *kil*, фланкированный терминаторами транскрипции, под контролем промотора *lac*, и тандем “слитых” генов *ompF-hegf* под контролем промотора *tac*, и имеющие, таким образом, общий механизм регуляции их экспрессии.

Полученной плазмидой трансформировали штаммы *E. coli* HB101 и TG1 и исследовали продукцию и локализацию hEGF, а также степень проницаемости внешней мембраны клеток для периплазматических белков при росте культур в условиях индукции промоторов *tac* и *lac*. Уровень синтеза и локализацию hEGF определяли с помощью иммуноферментного анализа, а степень проницаемости внешней мембраны клеток оценива-



**Рис. 1.** Схема конструирования экспрессионной плазмиды pPTK-hEGF<sub>2</sub>.

Показаны экспрессионные кассеты плазмид pUTKT, pTEGF и pPTK-hEGF<sub>2</sub>. Треугольниками обозначены фрагменты полилинкера pUC18. *P<sub>lac</sub>*, *P<sub>tac</sub>* – промоторы *lac* и *tac*, *T<sub>trpA\*</sub>* – модифицированный терминатор гена *trpA*, *T<sub>kil</sub>* и *T<sub>rrnB</sub>* – терминаторы гена *kil* и оперона *rrnB*. Указаны сайты рестриктаз, использованные в процессе клонирования.

ли по активности β-лактамазы (в качестве субстрата использован PADAC, см. “Эксперимент. часть”) в периплазме клеток и культуральной среде (табл. 1, 2). Штаммы *E. coli* TG1(pPTK-hEGF<sub>2</sub>) и НВ101(pPTK-hEGF<sub>2</sub>) культивировали в среде М9 с добавлением 0.5% казаминовых кислот при различных температурах (30, 35, 37°C). Для штамма TG1(pPTK-hEGF<sub>2</sub>) максимальная продукция hEGF

наблюдалась при температуре культивирования 35°C и времени культивирования 14 ч (табл. 1); для штамма НВ101(pPTK-hEGF<sub>2</sub>) – при 35°C и 18 ч (табл. 2). При этих условиях практически весь hEGF находился в культуральной среде, а в периплазматической фракции клеток сохранялось менее 5% рекомбинантного полипептида. Уровень продукции hEGF (по данным ИФА) составлял око-

**Таблица 1.** Накопление рекомбинантного hEGF и β-лактамазы в периплазме и культуральной среде штамма *E. coli* TG1(pPTK-hEGF<sub>2</sub>)

Время культивирования при 35°C, ч	Суммарный белок, мг/л		Накопление hEGF				Активность β-лактамазы			
	периплазма	среда	периплазма		среда		периплазма		среда	
			мг/л	%	мг/л	%	мкМ/мин	%	мкМ/мин	%
5	120	16	4.5	100	н. о.*	0	1.5	83	0.3	17
14	240	420	1.7	5	30	95	1.6	8	17.2	92
16	280	430	1.3	5	26	95	1.5	8	18.0	92
18	300	430	1.3	6	20	94	1.8	9	18.8	91

\* н. о. – не определяется.

**Таблица 2.** Накопление рекомбинантного hEGF и  $\beta$ -лактамазы в периплазме и культуральной среде штамма *E. coli* HB101(pРТК-hEGF<sub>2</sub>)

Время культивирования при 35°C, ч	Суммарный белок, мг/л		Накопление hEGF				Активность $\beta$ -лактамазы			
	периплазма	среда	периплазма		среда		периплазма		среда	
			мг/л	%	мг/л	%	мкМ/мин	%	мкМ/мин	%
8	248	30	4.0	100	н. о.*	0	2.75	73.3	1.0	26.6
16	320	380	1.9	7	26	93	1.75	10	16.2	90
18	320	400	1.4	4	32	96	1.5	9	16.0	91
20	280	420	1.2	4	26	96	1.9	10	16.2	90

\* н. о. – не определяется.

**Таблица 3.** Выделение и очистка рекомбинантного hEGF

Стадии очистки	Суммарный белок, мг	hEGF*	
		мг	%
Культуральная среда	330	22.0	100
Осаждение примесей уксусной кислотой	60	15.6	71
Концентрирование на силикагеле С <sub>18</sub>	25	6.7	31
Хроматография на DEAE-сефарозе	12	6.1	28
Хроматография на Q-сефарозе	5.9	5.6	26
С <sub>18</sub> -ВЭЖХ	5.0	5.0	23

\* Концентрацию hEGF определяли с помощью ИФА.

ло 25–30 мг белка на 1 л культуры. Процесс экскреции  $\beta$ -лактамазы в данных условиях культивирования протекает также достаточно эффективно и более 90% белка обнаруживается в культуральной среде. Однако 35–45% суммарных периплазматических белков остается в периплазме клеток. По-видимому, вероятность процесса экскреции белков в значительной степени зависит от степени их взаимодействия с другими компонентами периплазмы и, в частности, с клеточными мембранами.

При выделении hEGF из культуральной жидкости использовали кислотное осаждение для удаления основной части примесных белков, затем три стадии ионообменной хроматографии и ВЭЖХ. Количественные данные по выходу целевого белка на разных стадиях очистки препарата представлены в табл. 3. Концентрацию hEGF определяли методом ИФА. По данным SDS-электрофореза и обращенно-фазовой ВЭЖХ (аналитический вариант), чистота препарата превышала 97% (рис. 2).

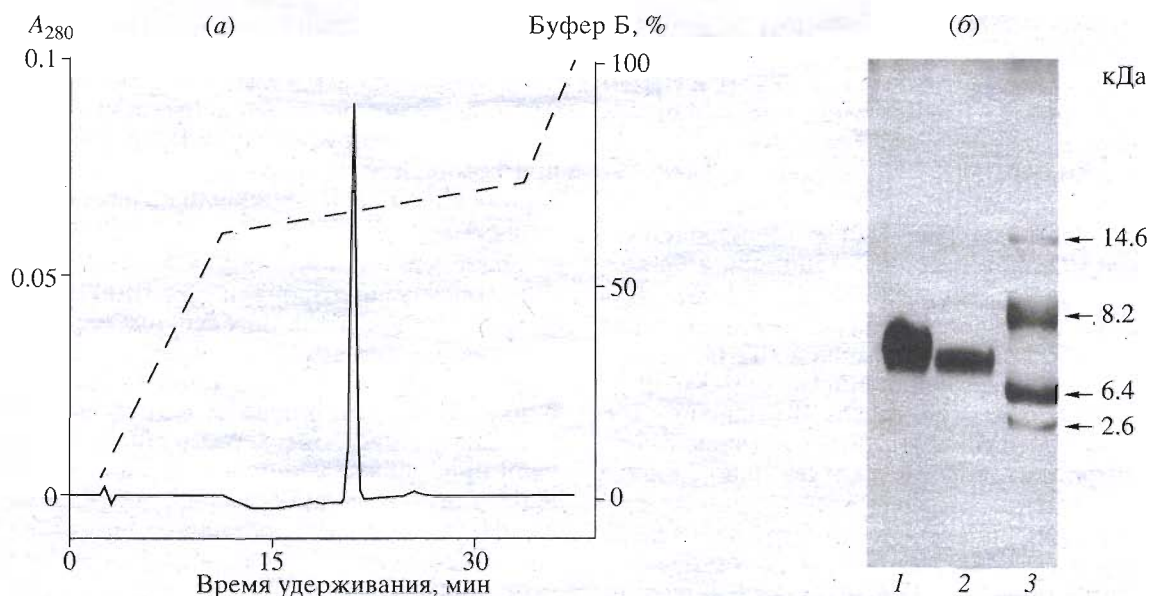
N-Концевая аминокислотная последовательность выделенного препарата белка соответствовала (по результатам 25 циклов секвенирования) известной N-концевой аминокислотной последовательности hEGF [1, 2].

Биологическую активность препарата hEGF анализировали в условиях *in vitro* и *in vivo*. Ана-

лиз включения [<sup>3</sup>H]тимидина в ДНК клеток кератиноцитов и фетальных фибробластов человека в присутствии hEGF в разных концентрациях показал, что препарат стимулирует синтез ДНК в районе концентраций 1–20 нг/мл; максимальный эффект наблюдался при концентрациях 5–10 нг/мл (данные не представлены). В тесте на “открытие глаз” новорожденных мышей (*in vivo*) на группах из 12 животных при дозе hEGF 200 пмоль на 1 г веса в день были получены следующие результаты: в контрольной группе открытие глаз наблюдали на 13–14-е сутки, в опытной группе – на 8–9-е сутки.

Таким образом, препарат рекомбинантного hEGF в процессе секреции и последующей экскреции в культуральную среду корректно процессируется лидерной пептидазой клеток *E. coli* и продуцируется в биологически активной форме. Следовательно, предлагаемая нами экспрессионная система, позволяющая осуществлять регулируемую экскрецию целевого полипептида в культуральную среду клеток *E. coli*, обеспечивает достаточно высокую продукцию биологически активного рекомбинантного hEGF, идентичного природному hEGF.

В последние годы сконструировано несколько экспрессионных плазмид с использованием регулируемой экспрессии белка K11 для регулируемой экскреции рекомбинантных белков в *E. coli*: секрция мышинового интерлейкина-2 в культураль-



**Рис. 2.** Обращенно-фазовая хроматография hEGF на колонке  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> (а); SDS-электрофорез hEGF в 18% ПААГ (б). а – 10 мкг препарата hEGF, колонка 4.6 × 250 мм, буфер А: 0.1% трифторуксусная кислота (ТФА) в 4% ацетонитриле, буфер В: 0.1% ТФА в 60% ацетонитриле, скорость протока 1 мл/мин. б – 1 – препарат hEGF (25 мкг), 2 – hEGF (5 мкг), 3 – маркеры молекулярных масс.

ную среду достигнута в результате экспрессии гена *kil* под контролем строго регулируемого промотора *pL* [23], секреция  $\beta$ -глюканазы в среду получена при использовании экспрессии гена *kil* под контролем промотора стационарной фазы *fic* [24]. Сконструированная нами экскреционная система, основанная на одном типе регуляции экспрессии гена целевого полипептида и гена *kil*, позволяет осуществлять одновременную индукцию как продукции рекомбинантного белка, так и механизма, обеспечивающего его секрецию в культуральную среду в клетках *E. coli*.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы фирмы “Difco” для приготовления бактериальных сред; LB-среду готовили как рекомендовано в работе [25].

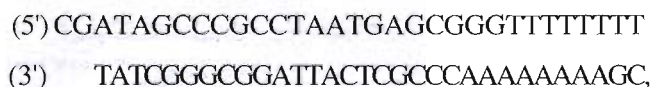
Генно-инженерные манипуляции проводили по стандартным методикам [25] или согласно рекомендациям фирм-производителей ферментов (Pharmacia, Швеция; Fermentas, Литва).

В качестве реципиентов использовали штаммы *E. coli* TG1 и HB101 [25].

SDS-электрофорез белков в полиакриламидном геле проводили по методу [26], для сканирования гелей, окрашенных кумасси R-250, использовали сканер CSD 200 (Beckman, США).

**Конструирование плазмиды pPTK-hEGF<sub>2</sub>.** *EcoRI-HpaII*-фрагмент (0.67 т.п.о.), включающий последовательности гена *kil* (0.14 т.п.о.) и его терминатора транскрипции, был получен из плазмиды ColE1 (Pharmacia, Швеция). Путем присоединения

олигонуклеотидных адаптеров концевые сайты рестрикции фрагмента были заменены: *EcoRI* на *PstI* и *HpaII* на *HindIII*, соответственно. *PstI-HindIII*-фрагмент был клонирован в плазмиде pUC18. Затем в полученной плазмиде pUTK по сайту *AccI* был клонирован двутяжевой олигонуклеотид:



кодирующий модифицированный терминатор транскрипции *T<sub>trpA</sub>* (плаزمиде pUTKT).

Плаزمида pBRP [27], несущая последовательность полилинкера из pUC18 от сайта *EcoRI* до *SphI*, была использована для получения плазмиды pBRP-tac путем клонирования *EcoRI-BamHI*-фрагмента плазмиды pDR540 (Pharmacia, Швеция), несущего последовательность промотора *tac*. Затем *PstI-PstI*-фрагмент плазмиды pBT-hEGF [9], кодирующий “слитый” ген *ompF-hegf*, был клонирован по сайту *PstI* плазмиды pBRP-tac. Полученная в результате этого плазмиде pTEGF содержала экспрессионную кассету “промотор *tac* – «слитый» ген *ompF-hegf*”, ограниченную сайтами *HindIII* и *PstI*.

При лигировании трех фрагментов: вектора, полученного при расщеплении плазмиды pUTKT рестриктазами *HindIII* и *PvuI*, *HindIII-BglII*-фрагмента плазмиды pTEGF и *BglII-PvuI*-фрагмента плазмиды pBT-hEGF<sub>2</sub> [9] была получена плазмиде pPTK-hEGF<sub>2</sub>, несущая экспрессионную кассету, включающую ген *kil*, фланкированный терминаторами транскрипции, под контролем промотора *tac*, и экспрессионную кассету, содержащую тан-

дем "слитых" генов *ompF-hegF* под контролем промотора *tac*.

Трансформацию штаммов *E. coli* TG1 и HB101 рекомбинантными плазмидами проводили по стандартной методике [25].

Периплазматическую фракцию клеточных белков получали по методу [28], инкубируя суспензии клеток в 1 М Трис-НСl (рН 9.0), содержащем 10 мМ EDTA, в течение 30 мин при 4°C.

**Определение активности β-лактамазы.** Для определения активности использовали субстрат PADAC (7-(тиенил-2-ацетиамидо)-3-[2-(4-*N,N*-диметиламинофенилазо)пиридинийметил]-3-цефен-4-карбоксихлорид) (Calbiochem, Швейцария). Изменение окраски субстрата под действием β-лактамазы с фиолетовой на желтую фиксировали при λ<sub>570</sub> (ε 49300).

При определении активности фермента в культуральной среде к 900 мкл Z-буфера (60 мМ гидрофосфат натрия, 40 мМ дигидрофосфат натрия, 10 мМ хлорид кальция, 1 мМ сульфат магния, 37.5 мМ меркаптоэтанол) добавляли 100 мкл культуральной среды и 10 мкл 2 мМ раствора PADAC в 2% уксусной кислоте. При определении активности β-лактамазы в периплазматической фракции к 980 мкл Z-буфера добавляли по 10 мкл раствора суммарных белков периплазматической фракции и 0.2 мМ раствора PADAC. Измерения A<sub>570</sub> проводили в течение 10 мин с интервалом 30 с. Активность фермента в мкМ/мин рассчитывали по формуле:

$$A = ((OD_0 - OD_n)/\epsilon)/n,$$

где OD<sub>0</sub> и OD<sub>*n*</sub> – оптическое поглощение при 570 нм в момент добавления субстрата и в момент времени *n*, *n* – время реакции в минутах, ε – молярный коэффициент поглощения PADAC.

**Определение уровня продукции hEGF.** 96-луночные полистирольные планшеты для микротитрования (Nunc, Дания) сенсифицировали инкубацией с кроличьей антисывороткой против hEGF (R-anti-EGF) в концентрации 1 мкг/мл в 0.05 М карбонатном буфере (рН 9.6) в течение 18 ч при 4°C (100 мкл раствора на одну лунку); сайты неспецифической сорбции блокировали 0.5% раствором желатина в фосфатно-солевом буфере PBS (137 мМ NaCl, 3 мМ KCl, 8 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (рН 7.2)) в течение 1 ч при 37°C. После каждой инкубации лунки промывали 0.9% раствором NaCl, содержащим 0.05% Твин-20. Затем в лунки вносили исследуемые образцы (как правило, разбавленный в 100–500 раз раствор культуральной среды или периплазматической фракции белков в PBS, содержащий 0.1% желатина и 5 нг/мл биотинилированного hEGF) и стандарты hEGF (начиная с концентрации 100 нг/мл с последующими двукратными разведениями) и инкубировали 2 ч при 37°C; после промывки в лунки вносили 100 мкл конъюгата стрептавидин–пероксидаза хрена (разведение 1/2000) в растворе 0.1%

желатина и 1% казеина и инкубировали 30 мин при 37°C. Ферментативную реакцию пероксидазы хрена в присутствии 0.4 мг/мл *o*-фенилендиамина и 0.03% перекиси водорода проводили в 0.15 М фосфат-цитратном буфере (рН 5.0) в течение 10 мин при комнатной температуре, останавливали 10% серной кислотой и оценивали по изменению величины A<sub>492</sub>.

**Выделение и очистка hEGF.** Культуру клеток (0.9 л) центрифугировали при 10000 *g* в течение 20 мин. Осадок удаляли, к супернатанту при перемешивании добавляли ледяную уксусную кислоту до рН 3.8. При этом большинство бактериальных белков выпадало в осадок, в то время как hEGF оставался в растворе. Суспензию центрифугировали при 10000 *g* в течение 10 мин. Затем рН супернатанта доводили до 5.5 добавлением 2 н. NaOH. Раствор наносили на колонку (2.5 × 5 см) с силикагелем C<sub>18</sub> (Sep-Pak, Waters, США), уравновешенным 10 мМ раствором уксусной кислоты и элюировали hEGF 60% ацетонитрилом. Фракции, содержащие hEGF (по данным SDS-электрофореза), объединяли и лиофилизировали. Препарат растворяли в 20 мМ Трис-НСl (рН 7.8), наносили на колонку (2.5 × 10 см) с DEAE-сефарозой (Pharmacia, Швеция), уравновешенной 20 мМ Трис-НСl (рН 7.8), и элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl (0–0.4 М) в том же буфере (объем градиента 250 мл). Фракции, содержащие hEGF, объединяли, разбавляли 20 мМ Трис-НСl (рН 7.8) до 0.1 М NaCl, наносили на колонку (2.5 × 10 см) с Q-сефарозой (Pharmacia, Швеция), уравновешенной 20 мМ Трис-НСl (рН 7.8), и элюировали белок в линейном градиенте концентрации NaCl (0.1–0.6 М) в том же буфере (объем градиента 250 мл). Препарат hEGF концентрировали и обессоливали на патроне C<sub>18</sub> Sep-Pak. В качестве последней стадии очистки применяли обращенно-фазовую ВЭЖХ на колонке μ-Bondapak C<sub>18</sub>, используя систему ацетонитрил-трифторуксусная кислота [9]. Фракции, содержащие гомогенный препарат hEGF, обессоливали на патроне C<sub>18</sub> Sep-Pak, определяли спектрофотометрически концентрацию белка и лиофилизировали препарат. Количественные данные по выходу hEGF на разных стадиях очистки препарата представлены в табл. 3. Концентрацию hEGF определяли методом ИФА. Гомогенность очищенного препарата по данным SDS-электрофореза и обращенно-фазовой ВЭЖХ (аналитический вариант, (рис. 2)) превышала 97%.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Определение *N*-концевой аминокислотной последовательности рекомбинантного hEGF было проведено И.В. Назимовым (ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова); определение биологической активности А.В. Васильевым (ИБР им. Н.К. Кольцова) и Л.Г. Эшкиндоном (ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова), за

что авторы выражают им искреннюю признательность.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Greenhalgh D.G. // J. Trauma. 1996. V. 41. P. 159–167.
2. Mario T., Matsuo H., Otani T., Mochizuki M. // Reprod. Fertil. Dev. 1995. V. 7. P. 1465–1470.
3. Schuller S., Knorr M., Steuhl K.P., Thiel H.J. // Ger. J. Ophthalmol. 1996. V. 5. P. 268–274.
4. Boonstra J., Rijken P., Humbel B., Cremers F., Verkleij A., van Bergen en Henegouwen P. // Cell Biol. Int. 1995. V. 19. P. 413–430.
5. Collins M.K.L., Perkins G.R., Rodriguez-Tarduchi G. // Bio Essays. 1994. V. 16. P. 133–138.
6. Smith J., Cook E., Fotheringham I., Pheby S., Derbyshire R., Eaton M.A.W., Doel M., Lilley D.M.J., Pardon J.F., Patel T., Lewis H., Bell L.D. // Nucl. Acid. Res. 1982. V. 10. P. 4467–4482.
7. Oka T., Sakamoto S., Miyoshi K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 7212–7216.
8. Kishimoto F., Gomi H., Kanaoka M., Nakatani T., Ito A., Katoh T., Agui H., Sumida S., Ogino S. // Gene. 1986. V. 45. P. 311–316.
9. Батчикова Н.В., Альтман И.Б., Луценко С.В., Смирнов В.А., Назимов И.В., Эшкинд Л.Г., Синягина Е.А., Ажаев А.В. // Биоорг. химия. 1992. Т. 18. С. 766–776.
10. Flock J.L., Fotheringham I., Light J., Bell L., Derbyshire R. // Mol. Gen. Genet. 1984. V. 195. P. 246–251.
11. Udrea M.S., Merryweather J.P., Mullenbach G.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. P. 7461–7465.
12. Clements J.M., Catlin G.H., Price M.J., Edwards R.M. // Gene. 1991. V. 106. P. 267–271.
13. Hamsa P.V., Kachroo P., Chattoo B.B. // Curr. Genet. 1998. V. 33. P. 231–237.
14. Yamagata H., Nakahama K., Suzuki Y., Kakinuma A., Tsukagoshi N., Udaka S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 3589–3590.
15. Le H.V., Trotta P.P. // Bioprocess Technol. 1991. V. 12. P. 163–181.
16. Kato C., Kudo T., Watanabe K., Horikoshi K. // Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1983. V. 18. P. 339–343.
17. Kato C., Kobayashi T., Kudo T., Horikoshi K. // FEMS Microbiol. Lett. 1986. V. 36. P. 31–34.
18. Hsiung H.M., Cantrell A., Luirink J., Oudega B., Veros A.J., Becker G.W. // BioTechnology. 1989. V. 7. P. 267–271.
19. Aono R. // Biochem. J. 1991. V. 275. P. 545–553.
20. Kato C., Kobayashi T., Kudo T., Furusato T., Murakami Y., Tanaka T., Baba H., Oishi T., Ohtsuka E., Ikehara M., Yanagida T., Kato H., Moriyama S., Horikoshi K. // Gene. 1987. V. 54. P. 197–202.
21. Nakamura S., Masegi T., Kitai K., Ichikawa Y., Kudo T., Aono R., Horikoshi K. // Agric. Biol. Chem. 1990. V. 54. P. 3241–3250.
22. Kitai K., Kudo T., Nakamura S., Masegi T., Ichikawa Y., Horikoshi K. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1988. V. 28. P. 52–56.
23. Robbens J., Raeymaekers A., Steidler L., Fiers W., Remaut E. // Protein Expr. Purif. 1995. V. 6. P. 481–486.
24. Miksch G., Fiedler E., Dobrowolski P., Friehs K. // Arch. Microbiol. 1997. V. 167. P. 143–150.
25. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. М.: Мир, 1984.
26. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
27. Птицын Л.П., Фатова М.А., Степанов А.И. // Молекул. генетика. 1990. № 2. С. 26–29.
28. Lall S.D., Eribo B.E., Jay J.M. J. // Microbiol. Meth. 1989. V. 9. P. 195–199.

## Extracellular Production of the Recombinant Human Epidermal Growth Factor (hEGF) by *Escherichia coli*

L. R. Ptitsyn<sup>#</sup> and I. B. Altman

RF GosNII GENETIKA State Research Center, Pervyi Dorozhnyi proezd 1, Moscow, 113545 Russia

An expression plasmid pPTK-hEGF<sub>2</sub> was constructed to provide for the extracellular production of recombinant human epidermal growth factor by the *Escherichia coli* cells. The plasmid contained two expression cassettes, one of which carried a tandem of the fused genes *ompF*–*hegf* under the control of the *tac* promoter, ensuring regulated secretion of hEGF into the *E. coli* periplasm, and another one contained the *kil* gene from the ColE1 plasmid under the control of *lac* promoter. The regulated low-level biosynthesis of Kil protein increased the permeability of *E. coli* outer membrane for periplasmic proteins. This enabled the recombinant proteins secreted into the cell periplasm to outflow into the cultural medium. As a result, the *E. coli* strains that harboured this plasmid construct produced effectively the recombinant hEGF into the cultural medium. The yields of hEGF produced by the nTG1(pPTK-hEGF<sub>2</sub>) and HB101(pPTK-hEGF<sub>2</sub>) strains reached 25 and 30 mg/l of cell culture after 14 and 18 h of cultivation, respectively. The hEGF preparation isolated possessed biological activity both *in vivo* and *in vitro*.

*Key words:* recombinant human epidermal growth factor (hEGF), *kil* gene; *E. coli*, producer strain, extracellular production, purification

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone +7 (095) 314-1858; e-mail: mashko@vnigen.msk.su