



УДК 577.214.622

## КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА СТРЕПТАВИДИНА ИЗ *Streptomyces avidinii* И ЕГО ЭКСПРЕССИЯ В *Escherichia coli*. СЕКРЕЦИЯ СТРЕПТАВИДИНА КЛЕТКАМИ *E. coli*

© 1999 г. В. П. Вейко<sup>#</sup>, Л. Б. Гулько, Н. А. Огорокова, Н. А. Дьяков, В. Г. ДебабовГосударственный научно-исследовательский институт  
генетики и селекции промышленных микроорганизмов,  
113545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1

Поступила в редакцию 28.04.98 г. Принята к печати 15.07.98 г.

Клонирован ген стрептавидина из *Streptomyces avidinii*, сконструирована экспрессионная плаزمиды и создан высокоэффективный штамм-продуцент стрептавидина. Показано, что лидерный пептид стрептавидина обеспечивает эффективную секрецию этого белка в периплазматическое пространство клеток *Escherichia coli*. Определено место отщепления лидерного пептида при секреции. Под действием суммарной фракции протеиназ, секретиремых в культуральную жидкость штаммом *S. avidinii*, получен “коровый” стрептавидин, сохраняющий биотинсвязывающую функцию.

Ключевые слова: стрептавидин; клонирование; секреция; ПЦР; *Escherichia coli*; *Streptomyces avidinii*.

Стрептавидин (SAV) – четырехсубъединичный негликозилированный белок, продуцируемый *Streptomyces avidinii* [1] и специфически связывающий *d*-биотин (каждая субъединица связывает одну молекулу биотина). Биологическая функция этого белка в клетках *S. avidinii* окончательно не выяснена, но предполагается [2], что он, как и авидин, играет защитную роль, подавляя рост биотинзависимых микроорганизмов. К настоящему времени аналоги стрептавидина (белки V1 и V2) обнаружены в *S. venezuelae* [3].

Основное свойство стрептавидина – связывание низкомолекулярного соединения – *d*-биотина ( $K_d 10^{-15}$  М); его механизм в настоящее время достаточно хорошо изучен [4], – стало предпосылкой к созданию широчайшего спектра высокочувствительных методов нерадиоактивной детекции биомолекул и способов введения остатка биотина в ДНК и белки [5–7].

В последнее время появились новые направления в использовании стрептавидина, связанные с особенностями распределения этого белка в органах млекопитающих при его экзогенном введении, а также с потенциальной возможностью адресной доставки препаратов, полученных на его основе, к клеткам злокачественных новообразований человека. Так, в работе [8] было показано, что экзогенное введение млекопитающим стрептавидина приводит к его накоплению в почках.

Учитывая этот факт, авторы работ [9, 10] сконструировали ген и получили химерный белок стрептавидин-металлотионеин, способный к связыванию ионов радиоактивных изотопов  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{109}\text{Cd}$  и др. Полученный комплекс нашел применение при терапии онкологических новообразований млекопитающих. Стрептавидин может быть также использован в составе химерной конструкции в качестве “белка-носителя”, к которому присоединены адресующая часть (например, соответствующее моноклональное антитело) и терапевтический агент химической или белковой природы [11, 12]. Подтверждением реализуемости такой задачи служат эксперименты, описанные в работе [13], где получена серия гибридных белков, имеющих в своем составе стрептавидин.

В связи с этим первым этапом работы, направленной на конструирование терапевтических агентов на основе стрептавидина, и предметом данного сообщения является создание эффективного штамма-продуцента этого белка. Нуклеотидная последовательность гена стрептавидина из *S. avidinii* известна [1], и в литературе описаны варианты получения штаммов-продуцентов соответствующего белка и его мутантных форм на основе *E. coli* [14, 15]. Однако поиск оптимальной структуры экспрессионной плазмиды и нуклеотидной последовательности гена привели к необходимости химического синтеза гена стрептавидина [16]. Это было обусловлено прежде всего высоким G/C-содержанием (до 69%) природного гена и неоптимальной для *E. coli* частотой использования кодонов, что, по мнению авторов работы [16], мешало экспрессии данного гена. Кроме того,

Символ “d” в формулах дезоксирибоолигонуклеотидов опущен.

<sup>#</sup> Автор для переписки (e-mail: veiko@vniigen.msk.su; тел.: (095) 314-81-73, (095) 394-81-14).

экспрессионный вектор, содержащий нативный ген прострептавидина (включающего лидерную последовательность), приводил к получению неактивного белка [14]. В связи с этим авторы работы [14] вынуждены были клонировать только лишь структурную часть гена стрептавидина из *S. avidinii*. Тем не менее роль лидерного пептида стрептавидина как в функционировании, так и в потенциальной возможности секреции белка при экспрессии гена в *E. coli* [17] оставалась, на наш взгляд, до конца непоясненной.

Вышеуказанные данные поставили перед нами задачу клонирования нативной структурной части гена стрептавидина из *S. avidinii*, включающей в свой состав последовательность, кодирующую лидерный пептид. Ген получали ПЦР-амплификацией (см. "Эксперимент. часть") соответствующего участка хромосомной ДНК из *S. avidinii* с использованием синтетических праймеров (1) и (2).

*Bam*HI

5' CGTGGGATCCATGCGCAAATCGTCGTTG (1)

*Sal*GI

5' CGGGGTCGACTTACTGCTGAACTGCGTC (2)

В их последовательность были введены сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции.

Полученный фрагмент ДНК размером 571 п.о., кодирующий структурную часть гена прострептавидина, выделяли препаративным электрофорезом в 1.2% агарозном геле и клонировали по сайтам эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Sal*GI в сконструированном нами ранее экспрессионном векторе pUU18 [18]. Полученной плазмидой pSAV27 (рис. 1) трансформировали штамм *E. coli* С600. Нуклеотидную последовательность клонированного фрагмента подтверждали секвенированием.

Исследование уровня накопления стрептавидина и его локализацию в клетках штамма-продуцента проводили с использованием электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях (рис. 2). Видно, что полученная экспрессионная система приводит к существенному накоплению стрептавидина (18 кДа) именно в периплазматическом пространстве клеток штамма-продуцента (рис. 2, дорожка 2). Следовательно, лидерный пептид прострептавидина обеспечивает в условиях гетерологичной экспрессии эффективную секрецию белка в периплазматическое пространство клеток *E. coli*. При этом белок остается активным, что подтверждается дополнительными экспериментами по связыванию биотинсодержащего олигонуклеотида (см. ниже) суммарными белками соответствующих фракций клеток штамма-продуцента (рис. 3). Одновременно с этим обращает на себя внимание значительный уровень накопления целевого белка без существенного замедления роста клеток штамма-продуцента по сравнению с

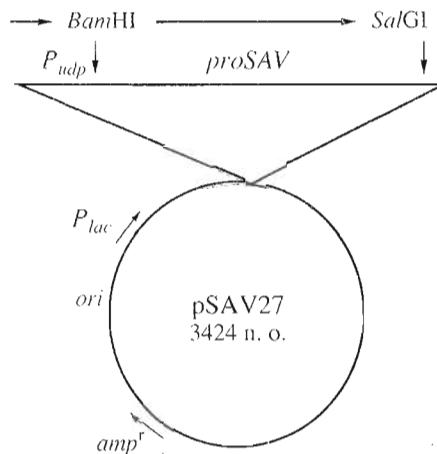


Рис. 1. Экспрессионная плаزمида pSAV27. *P<sub>udp</sub>* – промотор-операторная область гена *udp* из *E. coli*, *proSAV* – структурная часть гена прострептавидина.

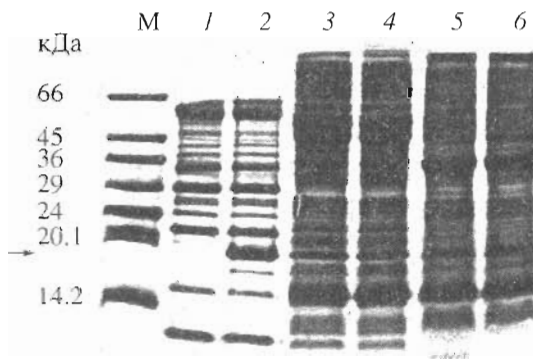
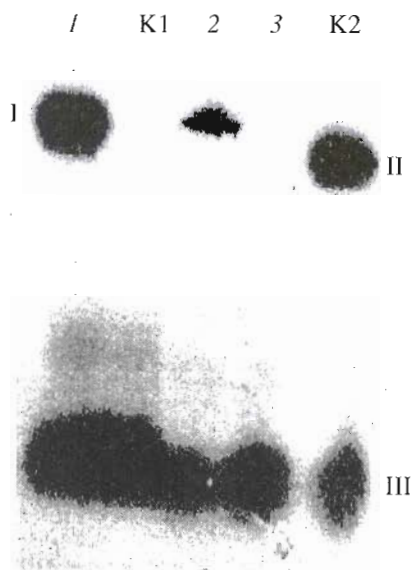


Рис. 2. Электрофоретическое разделение в денатурирующем ПААГ белков периплазматических (1, 2), цитоплазматических (3, 4) и мембранных (5, 6) фракций штамма-реципиента (1, 3, 5) и штамма-продуцента (2, 4, 6). М – белки-маркеры. Стрелкой показана полоса, соответствующая стрептавидину (дорожка 2).

исходным реципиентным штаммом (данные по кинетике не приводятся). Эксперименты, направленные на изучение влияния экзогенного *d*-биотина на рост клеток штамма-продуцента как на минимальной (М9), так и на богатой (*L*-бульон) среде, показали отсутствие существенного влияния добавки на скорость роста клеток штамма-продуцента. Этот факт снимает также вопрос токсичности стрептавидина для клеток *E. coli* [14].

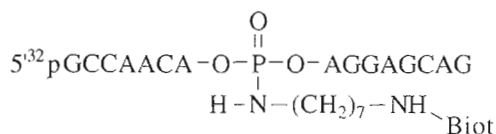
Одна из существенных проблем, возникающих при выделении рекомбинантного стрептавидина, связана с формой получаемого белка. В литературе описаны варианты, когда стрептавидин либо находился в нерастворимой форме, либо был локализован в составе телец включения [14, 16], что требовало проведения стадии денатурации–ренатурации. Мы показали, что секретируемый в периплазму стрептавидин находится в растворимой форме, что предопределило метод выделения



**Рис. 3.** Радиоавтограф электрофоретического разделения в ПААГ денатурированных продуктов связывания биотинилированного радиоактивно меченого олигонуклеотида суммарными белками различных фракций клеток штамма-продуцента стрептавицина: I – периплазматическая фракция; 2 – мембранная фракция; 3 – цитоплазматическая фракция; K1 – периплазматическая фракция в смеси с меченым олигонуклеотидом, не содержащим остаток биотина; K2 – процессированный стрептавидин фирмы “Sigma” (США), связанный с меченым биотинилированным олигонуклеотидом; I – стрептавидин; II – процессированный стрептавидин; III – меченый олигонуклеотид.

белка [19], исключая стадию денатурации-ренатурации. Клетки штамма-продуцента *E. coli* для препаративного выделения SAV культивировали в лабораторных ферментерах “Anglicon” (Англия). После отделения биомассы получали периплазматическую фракцию клеток, из которой выделяли стрептавидин ионообменной хроматографией на колонке с Q-сефарозой. Гомогенность полученного препарата подтверждали электрофорезом в ПААГ как в нативном виде, так и после денатурации (рис. 4а). Выход выделенного гомогенного белка составил 170–180 мг/л культуральной жидкости.

Для исследования связывания полученного стрептавицина с *d*-биотином мы использовали синтетический олигонуклеотид, полученный по ранее предложенной нами схеме [20].



Данный олигонуклеотид содержит остаток биотина, введенный по межнуклеотидной фосфатной группе, что позволяет осуществлять его дополнительное радиоактивное мечение фосфори-

рованием с помощью полинуклеотидкиназы бактериофага T4 и  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ .

После проведения комплексообразования олигонуклеотид–стрептавидин, смесь разделяли в ПААГ и образовавшийся комплекс выявляли радиоавтографией (рис. 4б). Олигонуклеотид, аналогичный биотинилированному, но не содержащий остаток биотина, не связывался со стрептавидином (рис. 3, дорожка K1), что свидетельствует об отсутствии неспецифического связывания олигонуклеотида со стрептавидином. Данный подход позволил не только детектировать связывание биотинового остатка со стрептавидином (рис. 3, дорожка I), но и, измеряя радиоактивность соответствующих зон ПААГ, провести сравнительную количественную оценку эффективности связывания. В качестве контрольного препарата использовали стрептавидин фирмы “Sigma” (США). Полученные данные позволили утверждать, что выделенный нами рекомбинантный стрептавидин связывает 3.7–3.8 ммоль остатка биотина на 1 ммоль тетрамера стрептавицина.

Дальнейшее исследование было направлено на изучение процессинга прострептавицина в клетках *E. coli*. Как показал анализ *N*-концевой последовательности выделенного белка, отщепление лидерного пептида происходит по связи  $\text{-S-A}^{22}\downarrow^{23}\text{S-A-D-P-S-K-}$ , что не совпадает с указанным ранее местом расщепления  $\text{-S-A-S-A}^{24}\downarrow^{25}\text{D-P-S-K-}$  для *S. avidinii* [1]. Следует отметить, что в литературе нет единого мнения о посттрансляционном процессинге стрептавицина. Более того, анализ ряда препаратов стрептавицина различных фирм и различного способа выделения показал, что при сохранении биотинсвязывающей активности, имеются существенные различия в структуре этих белков как в *N*-, так и в *C*-последовательностях [21]. В целом можно отметить, что при протеолизе не затрагивается лишь так называемая “коровая часть” стрептавицина [16].

Мы предприняли эксперименты по процессингу выделенного нами стрептавицина с помощью суммарных протеиназ, секретируемых *S. avidinii* в культуральную жидкость [21]. Как показали результаты электрофоретического анализа препарата после протеолиза, исходный белок расщепляется до “корового” стрептавицина, совпадающего по молекулярной массе с препаратом фирмы “Sigma” (рис. 4, дорожки 3 и б). Полученный “коровый” стрептавидин сохраняет биологическую активность (связывание *d*-биотина) на уровне непротесированного белка. Эти данные позволяют предположить, что в исходном штамме окончательный процессинг стрептавицина из *S. avidinii* происходит после его секреции уже непосредственно в культуральной жидкости.

Таким образом в результате работы клонирован ген прострептавицина, сконструирована плаз-

мида, обеспечивающая секрецию стрептавидина в периплазматическое пространство клеток *E. coli*, получен высокоэффективный штамм-продукцент этого белка. Показано, что рекомбинантный стрептавидин находится в клетке *E. coli* в растворимом виде и сохраняет практически полную биологическую активность.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали агарозу, борную кислоту, акриламид, *N,N*-метиленбисакриламид, Трис-основание, SDS, глицин, EDTA, АТФ, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты и стрептавидин (Sigma, США), соли (Merck, Германия), набор белковых маркеров (Pharmacia, Швеция), мембраны для ультрафильтрации (Amicon, США), <sup>32</sup>P-меченные дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (НПО "Нуклон", Россия). Все остальные реактивы – отечественного производства квалификации х. ч. и ос. ч.

**Ферменты:** эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI, *Sal*GI (Biolabs, США), Т4-ДНК-лигаза и Т4-полинуклеотидкиназа, модифицированная Т7-ДНК-полимераза (Amersham, Англия), *Taq*-полимераза (НПО "Ферментас", Литва), РНКаза А и протеиназа К (Sigma, США).

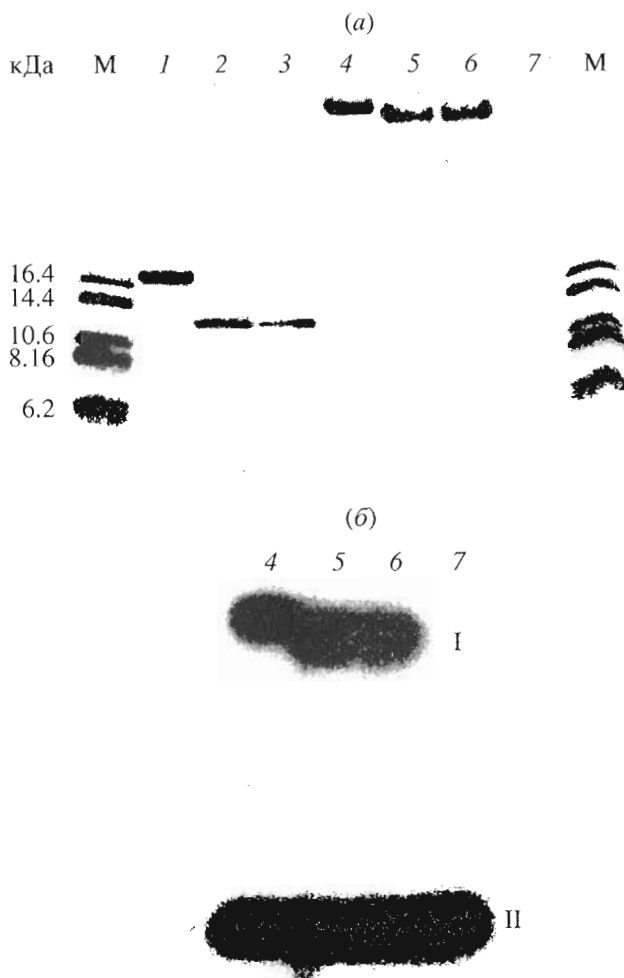
**Бактериальные штаммы:** *E. coli* C600 (*thi*, *thrB*, *lacZ*, *lacY*, *supE*, *tonA*, *recA*, Tn10Tc<sup>R</sup>) и *S. avidinii* получены из музея ГНИИ Генетика. Бактериальные клетки культивировали при 37°C на среде Лурия (*L*-бульон) либо минимальной (M9) [22, 23]. Для культивирования *S. avidinii* использовали агаризованную и жидкую среды R2YE [24]. Твердые среды содержали 1.5% агара. Компоненты сред – триптон, дрожжевой экстракт, агар и казиноновые кислоты – производства Difco (США). Для обеспечения селективного роста клеток применяли ампициллин (100 мкг/мл).

**Бактериальные плазмиды.** Использовали полученную нами ранее плазмиду pUU18 [18].

**Выделение плазмидной ДНК, приготовление компетентной культуры клеток *E. coli*, трансформацию и получение клеточных фракций** осуществляли согласно [22]. Хромосомную ДНК выделяли из *S. avidinii* как описано в [23].

**Получение суммарной фракции протеиназ** из *S. avidinii* и обработку ими рекомбинантного стрептавидина осуществляли как описано в [21].

**Амплификационная смесь** (50 мкл) содержала 10 мМ Трис-НСI (pH 8.4), 0.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ KCl, 0.2 мМ dNTP, 10 нг амплифицируемой ДНК-матрицы, по 50 пмоль праймера (1) и (2) и 2.5 ед. акт. *Taq*-полимеразы. Режим амплификации (°С): 1 цикл – 95/120 – денатурация хромосомной ДНК; 7 циклов – денатурация 95/10, отжиг 48/10, элонгация 72/30; 25 циклов – денатурация 95/10, отжиг 60/10, элонгация 72/30.



**Рис. 4.** Электрофоретический анализ в 12% ПААГ (0.1% SDS) очищенного рекомбинантного стрептавидина (1), его же после обработки протеиназами *S. avidinii* (2), стрептавидина "Sigma" (3) и неденатурированных комплексов этих же препаратов с радиоактивно меченным биотинилированным олигонуклеотидом (дорожки 4, 5, 6 соответственно). М – белки-маркеры. Окрашивание геля Кумасси (а) и радиоавтограф (б). I – Комплекс стрептавидин–олигонуклеотид; II – олигонуклеотид.

Дезоксирибоолигонуклеотиды синтезировали и выделяли согласно работе [20].

Первичную последовательность ДНК определяли по методу Сэнгера [24].

Электрофорез пептидов проводили в 12% ПААГ, содержащем 0.1% SDS (денатурирующий гель) согласно [25]. Образцы белков для денатурации непосредственно перед нанесением прогревали кипячением (5 мин) на водяной бане. Предварительные эксперименты показали, что компоненты ПААГ, включая 0.1% SDS, не оказывают влияния на стабильность комплекса биотинилированный олигонуклеотид–стрептавидин при электрофоретическом разделении. Поэтому неденатурированные комплексы стрептавидин–олигонук-

леотид наносили на денатурирующий гель без предварительного кипячения. Уровень связывания биотина рекомбинантным стрептавидином определяли на приборе "Delta 300" фирмы "Tracor Analytic" (США) по радиоактивности полосы, соответствующей комплексу олигонуклеотид-стрептавидин, после разделения смеси в ПААГ. В качестве контрольного препарата использовали стрептавидин фирмы "Sigma" (США) (рис. 4б, дорожка б).

Концентрацию растворов белков определяли по Брэдфорд [26].

N-Концевую последовательность белка определяли деградацией по Эдману на секвенаторе "Beckman" 890В (США). Идентификацию Pth-производных аминокислот осуществляли методом ВЭЖХ на колонках "Zorbax РТН" (Франция).

Работа выполнялась в рамках программы правительства Москвы "Разработка и внедрение в медицинскую практику новых методов диагностики и лечения онкологических заболеваний".

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Argarana C.E., Kuntz I.D., Birken S., Axel R., Cantor C.R. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. P. 1871–1882.
2. Green N.M. // Methods Enzymol. 1990. V. 184. P. 51–67.
3. Bayer E.A., Kulik T., Adar R., Wilchek M. // Biochim. Biophys. Acta, Gene Struct. Expr. 1995. № 1263. P. 60–66.
4. Weber P.C., Pantoliano M.W., Thompson L.D. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 9350–9354.
5. Diamandis E.P., Christopoulos T.K. // Clin. Chem. 1991. V. 37. P. 625–636.
6. Ильяна А.В., Рабинков А.Г., Вухрева Е.В., Габубов А.Г. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 354–357.
7. Olejnik J., Sonar S., Krzymanska-Olejnik E., Rothschild K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 7590–7594.
8. Schechter B., Arnon R., Colas C., Burakova T., Wilchek M. // Kidney Intern. 1995. V. 47. P. 1327–1335.
9. Sano T., Glazer A.N., Cantor C.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 1534–1538.
10. Virzi F., Winnard P., Fogarasi M., Sano T., Smith C.L., Cantor C.R., Rusckowski M., Hnatowich D.J. // Bioconjugate Chem. 1995. V. 6. P. 139–144.
11. Meyer B.F., Stoner M.L., Raphael C.L., Davis R.E., Herrman R.P. // Exp. Hematol. 1991. V. 19. P. 710–713.
12. Dubel S., Breitling F., Kontermann R., Schmidt T., Skerra A., Little M. // J. Immunol. Methods. 1995. V. 178. P. 201–209.
13. Ефимов В.А., Фрадков А.Ф., Калинин А.Л., Чахмачева О.Г. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 9–16.
14. Sano T., Cantor C.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 142–146.
15. Chilkoti A., Schwartz B.L., Smith R.D., Long C.J., Stayton P.S. // Biotechnology. 1995. V. 13. P. 1198–1204.
16. Thompson L.D., Weber P.C. // Gene. 1993. V. 136. P. 243–246.
17. Walsh M.K., Swaisgood H.G. // Biotechnol. and Bioengin. 1994. V. 44. P. 1348–1354.
18. Вейко В.П., Осипов А.С., Шехтер И.И., Буленков М.Т., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Чибискова Н.А., Эррайс Л.Л., Деревщицова Е.Б., Дебабов В.Г. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 354–358.
19. Chilkoti A., Tan P.H., Stayton P.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 1754–1758.
20. Вейко В.П., Ратманова К.И., Осипов А.С., Буленков М.Т., Пугачев В.В. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. С. 625–629.
21. Bayer E.A., Ben-Hur H., Hiller Y., Wilchek M. // Biochem. J. 1989. V. 259. P. 369–376.
22. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. М.: Мир, 1984.
23. Hopwood D.A., Bibb M.J., Chater K.F., Kieser T., Bruton C.J., Kieser H.M., Lydiate D.J., Smith C.P., Ward J.M., Schrepf H. Genetic Manipulation of *Streptomyces*. A Laboratory Manual. Norwich: The John Innes Foundation, 1985.
24. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // J. Mol. Biol. 1975. V. 94. P. 441–446.
25. Schagger H., Jagow G. // Anal. Biochem. 1987. V. 166. P. 368–379.
26. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248.

## Cloning and Expression of the Streptavidin Gene from *Streptomyces avidinii* in *Escherichia coli* and Secretion of Streptavidin by *E. coli* Cells

V. P. Veiko<sup>#</sup>, L. B. Gul'ko, N. A. Okorokova, N. A. D'yakov, and V. G. Debabov

State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms,  
Pervyi Dorozhnyi proezd 1, Moscow, 113545 Russia

The streptavidin gene from *Streptomyces avidinii* was cloned, an expression plasmid constructed, and a highly effective strain producer of streptavidin created. It was shown that the leader peptide of streptavidin ensures the effective secretion of this protein into the periplasmic space of *Escherichia coli* cells. The degradation site of the leader peptide was detected. Upon treatment with the total fraction of proteases secreted by *S. avidinii* into the culture medium, "core" streptavidin was obtained, which retained the biotin-binding function.

*Key words:* streptavidin, cloning, secretion, PCR, *Escherichia coli*, *Streptomyces avidinii*

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 314-8173, +7 (095) 394-8114; e-mail: veiko@vnigen.msk.su.