

УДК 577.112.4.

П.Л. СТАРОКАДОМСКИЙ, И.Я. ДУБЕЙ,
О.В. ОКУНЕВ, Д.М. ИРОДОВ

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев
E-mail: p.l.starokadomski@imbg.org.ua

КОНСТРУИРОВАНИЕ ХИМЕРНОГО ИНТЕИН-СОДЕРЖАЩЕГО БЕЛКА И ОЦЕНКА УСЛОВИЙ ЕГО РАСЩЕПЛЕНИЯ



Белковым сплайсингом называют пост-трансляционное автокаталитическое вырезание внутренней белковой последовательности (интеина) с последующим лигированием фланкирующих пептидов (экстеинов). Высокая специфичность расщепления белков-предшественников, которая обеспечивается интеинами, позволяет использовать белковый сплайсинг в биотехнологических целях. Цель работы — получение в клетках *E. coli* рекомбинантного гормона роста человека с нативным N-концом. Для этого был создан химерный белок, состоящий из короткого N-концевого пептида, интеина Mxe GyrA и гормона роста человека. В процессе трансляции формилметионином модифицируется N-концевой пептид, впоследствии удаляющийся. Показано, что интеин обеспечивал отщепление экстеинов, однако последующего их лигирования не происходило. Это позволило получить гормон роста человека с нативным N-концом. Исследовано влияние различных факторов на эффективность расщепления. Установлено, что наилучший результат расщепления химерного белка (60–80 %) достигается при добавлении индуктора (100 мМ β -меркаптоэтанол) с инкубацией в течение 4–6 сут.

© П.Л. СТАРОКАДОМСКИЙ, И.Я. ДУБЕЙ, О.В. ОКУНЕВ,
Д.М. ИРОДОВ, 2007

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2007. № 2

Введение. Использование рекомбинантных бактериальных продуцентов для синтеза эукариотических белков часто сопряжено с рядом сложностей. Поскольку многие из целевых белков предназначены для использования в фармакологических целях, продукт не должен содержать иммуногенные примеси прокариотических белков. Методы очистки целевого белка с помощью ионообменных, гидрофобных или аффинных сорбентов часто бывают дорогостоящими, трудоемкими и приводят к значительным потерям. Кроме того, многие эукариотические белки, экспрессируемые в клетках прокариот, являются токсическими для клетки-продуцента. Это не позволяет наращивать ряд необходимых белков в достаточных количествах. Серьезной проблемой является также N-концевая модификация эукариотических белков формилметионином (fMet). В норме в клетках *E. coli* специфические ферменты (метионинаминопептидазы) удаляют N-концевой формилметионин у большинства растущих полипептидов на ранних стадиях белкового синтеза [1]. Однако известно, что рекомбинантные белки часто несут на N-конце fMet, который не успевает удаляться. Как правило, наличие дополнительной аминокислоты на N-конце не приводит к изменению биологической активности белка по сравнению с природным аналогом. Однако использование такого рекомбинантного белка в качестве медицинского препарата может стать причиной нежелательного иммунного ответа организма. Обработка же полученного продукта *in vitro* метионинаминопептидазами либо химическими агентами часто не дает желаемого результата.

Поэтому актуальной задачей является разработка новых подходов, позволяющих максимально упростить получение целевого рекомбинантного белка. В связи с этим повышенный интерес вызывают системы для очистки белков на основе использования интеинов [2, 3], которые являются внутренними аминокислотными последовательностями, способными к автокаталитическому удалению из молекулы полипептида с последующим лигированием фланкирующих пептидов в один белок [4]. Использование модифицированных интеинов позволяет создать систему с самоуудаляющейся аффинной меткой для очистки целевого белка [2, 3, 5]. Кроме того, использование интеинов

позволяет получать целевой белок с нативным N-концом. Это становится возможным при слиянии целевого белка с C-концом интеина, в результате чего fMet будет присоединяться к N-концу химерного полипептида и затем отделяться вместе с интеином [3]. Использование систем экспрессии на основе интеинов несет в себе и ряд других преимуществ: например, возможность ковалентно иммобилизовать молекулу белка на поверхность носителя, лигировать белки друг с другом, решить проблему токсичности рекомбинантных белков для клетки-продуцента и т.п. [6, 7].

В настоящей работе рассмотрена возможность использования интеина в качестве самовырезающегося фрагмента в составе химерного белка, состоящего из лигированных между собой N-концевого лидерного пептида, интеина Mxe GyrA и гормона роста человека (Hgh). Целью работы было получение в клетках *E. coli* гормона роста человека с нативным N-концом и определение условий автокаталитического вырезания гормона роста из молекулы химерного белка.

Материалы и методы. *Штаммы, среды и условия выращивания.* Для конструирования и амплификации плазмид использовали штамм *E. coli* DH10B. Нарботка интеина проводилась в штамме *E. coli* BL DE3 [8]. Трансформанты штаммов *E. coli* DH10B или BL DE3 выращивали при 37 °C на среде Лурия-Бертрани (LB) с добавлением канамицина (50 мкг/мл). На той же основе готовили 2%-ную агаризированную среду.

Плазмиды и молекулярно-генетические манипуляции. Выделение плазмидной ДНК, рестрикцию, лигирование, электрофорез в агарозном геле, трансформацию с помощью CaCl₂ проводили стандартными методами [8]. Химерный белок конструировали в два этапа. Конструкция, состоящая из адаптированного для экспрессии в *E. coli* 5'-фрагмента последовательности гена мальтозо-связывающего белка (ATG AAG ATC GAA GAG GGC AAG GTG ATC GGC TCA TTA GAG GGT), гена интеина Mxe GyrA (594 п.н., Genebank accession number U 67876) и 5'-фрагмента гена hgh (88 п.н., Genebank N K02382) была получена путем химико-ферментативного синтеза. Полученная последовательность, фланкированная сайта-

ми рестрикции *Nde*I и *Eco*RI, была клонирована в ранее сконструированную плазмиду pET24 hgh (pET24a(+)) (Novagen) [9], содержащую полноразмерный ген hgh [Genebank N K02382] (рис. 1, а), из которой предварительно был выщеплен *Nde*I/*Eco*RI фрагмент. В результате плазида, содержащая химерный ген 14aa-int-hgh под контролем фагового промотора, была названа pET24 int-hgh (рис. 1, б), а химерный белок — Int-hgh.

Получение и выделение химерного белка. Индукцию синтеза белка Int-hgh при достижении плотности культуры OD = 0,5 ($\lambda = 600$ нм) проводили с помощью добавления 1 мМ изопротилтиогалактозида (ИПТГ) и последующей инкубации на протяжении 12–14 ч. Клетки осаждали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 мин, промывали фосфатным буфером (0,05 М PBS, pH 7,4, ICN) и растворяли в этом же буфере, содержащем 8 М мочевины («Amersham», США). Полученные пробы центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 10 мин. Мочевину из надосадочной жидкости удаляли путем гель-фильтрации, используя колонку NAP-10 («Amersham», США), уравновешенную PBS (pH 7,4), при скорости потока 0,5 мл/мин.

SH-сефароза. Тиопропил-сефарозу синтезировали по модифицированному методу, ранее описанному для синтеза тиопропил-агарозы [10]. Для этого 5 мл сорбента Sepharose CL-4B (Pharmacia) промывали водой (3 × 5 мл) и суспендировали в 10 мл 1 М NaOH, содержащего 50 мг боргидрида натрия. К суспензии добавляли 0,5 мл эпихлоргидрина и перемешивали смесь в течение 18 ч при комнатной температуре. Полученную оксиран-активированную сефарозу фильтровали и промывали водой до нейтрального pH элюата, а затем 5 мл 0,1 М ацетата натрия (pH 6,2). Добавляли 10 мл 2 М тиосульфата натрия и перемешивали смесь в течение ночи при комнатной температуре. Сорбент отфильтровывали, промывали водой (5 × 5 мл) и добавляли 5 мл 1%-ного раствора дитиотреитола (ДТТ) в 1 мМ ЭДТА. После 30 мин перемешивания полученную тиол-сефарозу отфильтровывали и промывали последовательно водой (2 × 5 мл); 0,1 М NaHCO₃, содержащим 1 мМ NaCl и 1 мМ ЭДТА (2 × 5 мл); 1 мМ ЭДТА (5 мл); 10 мМ ацетатом натрия с

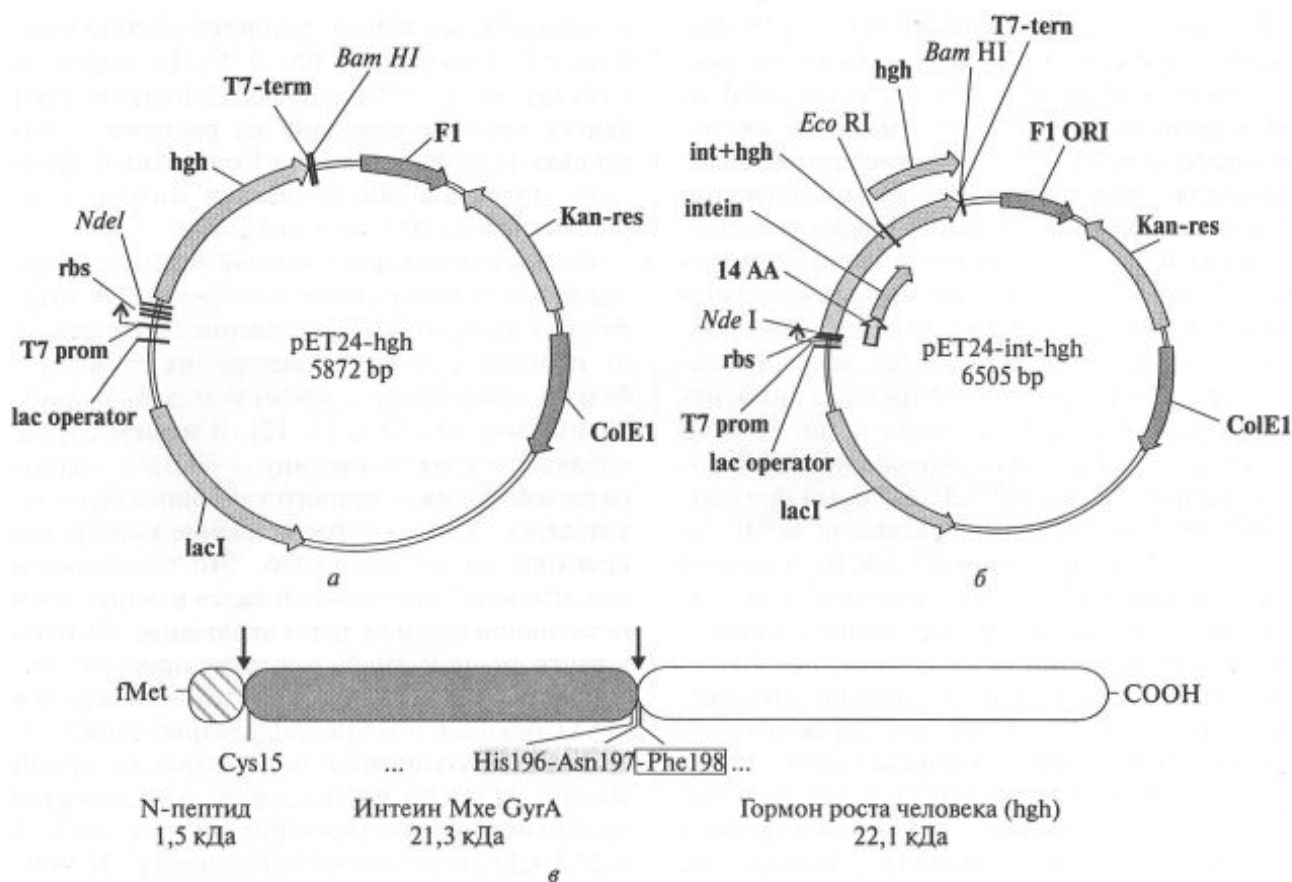


Рис. 1. Схема плазмиды pET24-hgh (а), плазмиды pET24-int-hgh (б) и химерного белка int-hgh (в) (указаны критические для расщепления аминокислотные остатки; стрелками указаны сайты автокаталитического расщепления)

1 мМ ЭДТА (рН 4, 2 × 5 мл). Следует исключить попадание воздуха в гранулы сорбента во время промывок. SH-сефарозу хранят в дегазированном 10 мМ ацетате натрия (рН 4) в атмосфере азота. Сорбент, хранившийся в течение продолжительного времени, перед использованием восстанавливают обработкой 1%-ным раствором ДТТ в 1 мМ ЭДТА.

Подбор условий расщепления химерного белка. Оценка эффективности протекания С-концевого отщепления Ngh проводили в зависимости от времени инкубации (1, 3, 6 сут инкубации); индуктора расщепления (50 мМ ДТТ («Serva», Германия), 100 мМ β-меркаптоэтанол (Sigma), тиол-модифицированная сефароза, восстановленный глутатион («Синбиас», Украина)); температуры инкубации (4, 20, 37 °С). Инкубацию проводили в буфере PBS (рН 7,4), содержащем 0,3 % азиды натрия. Оценка влия-

ния рН среды (рН 5,0; 7,4; 8,0; 9,5) на эффективность отщепления Ngh осуществляли в буфере PBS, содержащем 0,3%-ный азид натрия, с соответствующими значениями рН. Анализ проводили с помощью электрофореза в денатурирующем 16%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) по стандартным методикам [11] с использованием маркера hgh собственного получения. В лунку вносили 25—40 мкг белка. После электрофореза гели окрашивали Coomassie R250 по стандартной методике [11] и сканировали на приборе HP Deskjet Professional. Эффективность расщепления оценивали путем денситометрического определения относительного количества белков Int-hgh, Mxe GyrA и Ngh с помощью программы TotalLab 2.01.

Результаты исследований и их обсуждение. *Строение химерного интеин-содержащего белка.* На рис. 1, в представлена схема строения

химерного интеин-содержащего белка Int-hgh (далее — конструкт). N-экстеином в конструкте является лидерный пептид, состоящий из 14 N-концевых аминокислот мальтозо-связывающего белка. Его присутствие было необходимо для нормальной инициации трансляции белка в клетке [3]. Кроме того, наличие N-экстеина крайне важно для протекания отщепления C-экстеина [3], которым в нашем случае является Hgh. Конструкт был создан таким образом, что C-концевой сайт расщепления находится перед первой N-концевой аминокислотой гормона роста человека (рис. 1, в). В результате мы получили химерный белок с молекулярной массой 44,9 кДа, который при подходящих условиях должен расщепляться на N-пептид (1,5 кДа), интеин (21,3 кДа) и гормон роста человека (22,1 кДа). Теоретический анализ показал, что после вырезания интеином экстеинов лигирование последних, т.е. N-концевого пептида и Hgh, не должно происходить. Это объясняется тем, что эффективность лигирования во многом определяется первой аминокислотой C-экстеина [3, 6, 12]. В нативных условиях C-экстеин Mxe Suga содержит в позиции 1 остаток треонина [12]. В нашем же случае в этом месте находится первая аминокислота Hgh — Phe, чей боковой радикал не способен выступать акцептором N-экстеина.

Выделение химерного белка из клеток E. coli. Созданная нами система экспрессии обеспечивала достаточно высокий уровень синтеза конструкта Int-hgh. В клеточном лизате его количество достигало 15—25 % общего количества белка. Первые опыты показали, что подавляющее количество целевого белка накапливается в нерастворимых телах включения клетки-продуцента. Это позволило проводить первичную очистку белка от крупных фрагментов клеток, их белков и нуклеиновых кислот путем промывки буферами. Полученные тела включения легко растворялись в буфере с высоким содержанием денатурирующих агентов — 6 М гуанидина-гидрохлорида или 8 М мочевины. Для работы мы использовали 8 М раствор мочевины, поскольку он, в отличие от гуанидин-гидрохлорида, не влияет на качество СДС-электрофореза в ПААГ. Поскольку присутствие мочевины денатурирует молекулу интеина, блокируя расщепление исходного

конструкта, последний хранился именно в буфере с 8 М мочевиной при 0 °С. Для перевода конструкта в активную (сплайсирующую) форму удаляли мочевину из раствора с помощью гель-фильтрации. Корректный фолдинг молекулы обеспечивался низкой скоростью потока (0,5 мл/мин).

Подбор оптимальных условий для автокаталитического расщепления конструкта. В литературе показано, что отщепление C-экстеинов от подобных интеин-содержащих химерных белков происходит с эффективностью приблизительно 40—70 % [3, 12]. В нашем случае наблюдали схожую картину — достичь полного расщепления исходного химерного белка не удавалось. В клетках расщепление конструкта практически не протекало. Это объясняется тем, что конструкт накапливался в основном в неактивной форме в телах включения. Однако в растворенном виде конструкт проявлял активность. Анализ с помощью электрофореза в ПААГ показал, что в результате инкубации лизата клеток количество белка с молекулярной массой 44,9 кДа уменьшалось, а количество полипептидов с молекулярными массами 21,3 и 22,1 кДа увеличивалось (количество N-концевого фрагмента не оценивали ввиду его малой массы и высокой лабильности). Динамика их накопления свидетельствовала о том, что они являются продуктами расщепления конструкта, а молекулярная масса белков соответствовала конструкту Int-hgh, интеину и гормону роста человека (рис. 3). Отсутствие белка с молекулярной массой 23,6 кДа свидетельствовало, что лигирование экстеинов действительно не происходило.

Для дальнейшей работы было необходимо подобрать условия расщепления химерного белка. Оценивали влияние ряда факторов: время инкубации, вид и концентрацию индуктора расщепления, температуру, pH. Основные результаты представлены на рис. 3—7.

Первые эксперименты показали, что расщепление конструкта протекает довольно медленно — в течение 6 сут инкубации расщеплялось не более 30—40 % исходного конструкта. Однако при определенных условиях нам удалось добиться значительно более активного расщепления. Из литературы известно, что одними из наиболее эффективных индукторов

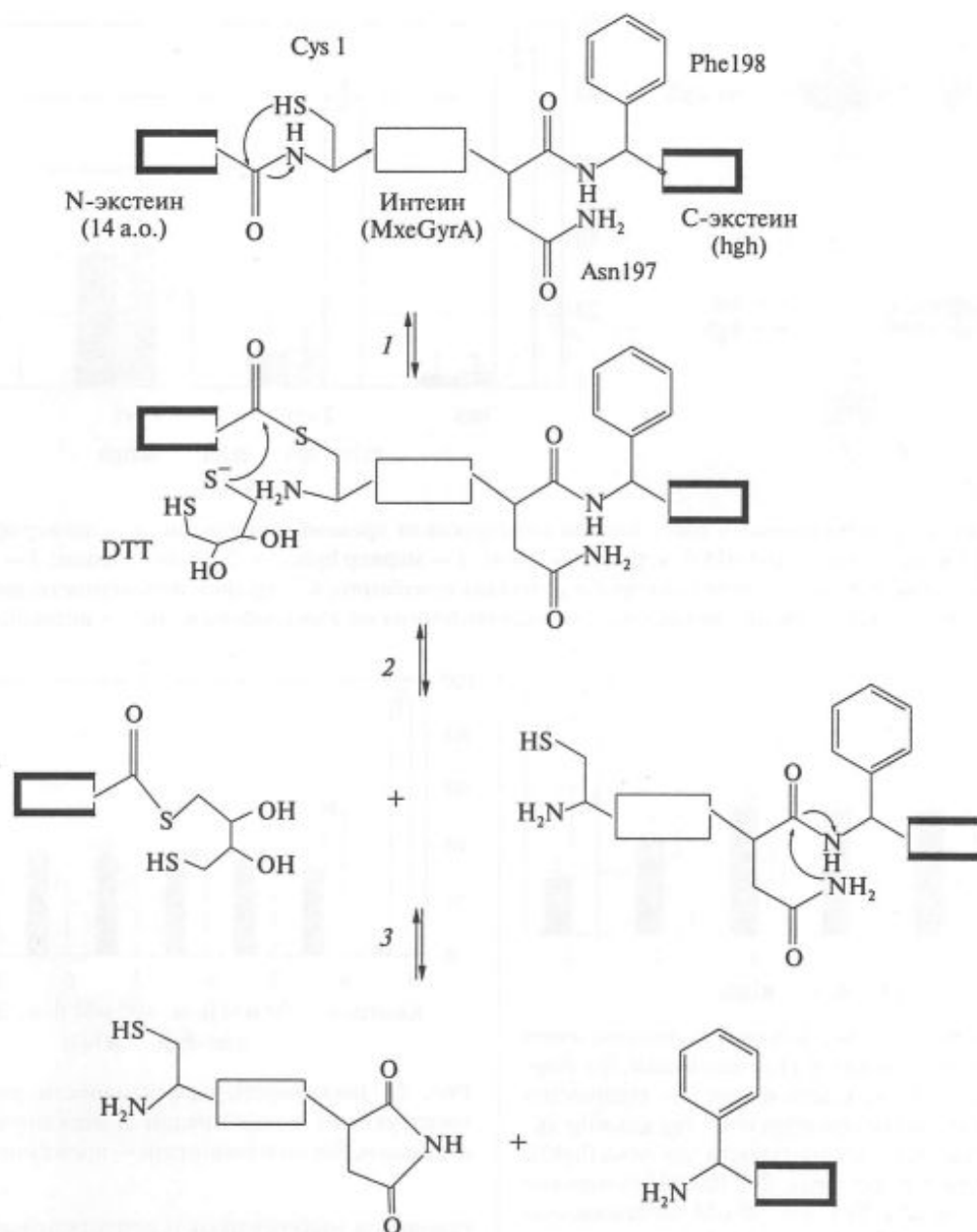


Рис. 2. Схема тиол-индуцированного интеин-опосредованного белкового расщепления: 1 — N-S ацильный сдвиг; 2 — индуцированное ДТТ N-концевое расщепление; 3 — циклизация Asp и C-концевое расщепление

расщепления являются тиольные соединения. Механизм их действия схематически представлен на рис. 2. Тиольная группа реагента нуклеофильно атакует пептидную связь на N-конце интеина, ковалентно модифицируя C-концевую аминокислоту N-экстеина. Это индуцирует N-концевое расщепление. Согласно принятой теории отщепление N-концевого экстеина ведет к изменению конформации те-

ла интеина, индуцируя протекание C-концевого отщепления (рис. 2, стадия 3) [3]. Действительно, в нашем случае добавление 100 мМ β-меркаптоэтанола значительно ускорило разрезание исходного конструкта, и уже через 4 сут концентрация продуктов реакции — Hgh и свободного интеина — значительно превышала концентрацию исходного химерного белка (рис. 3).

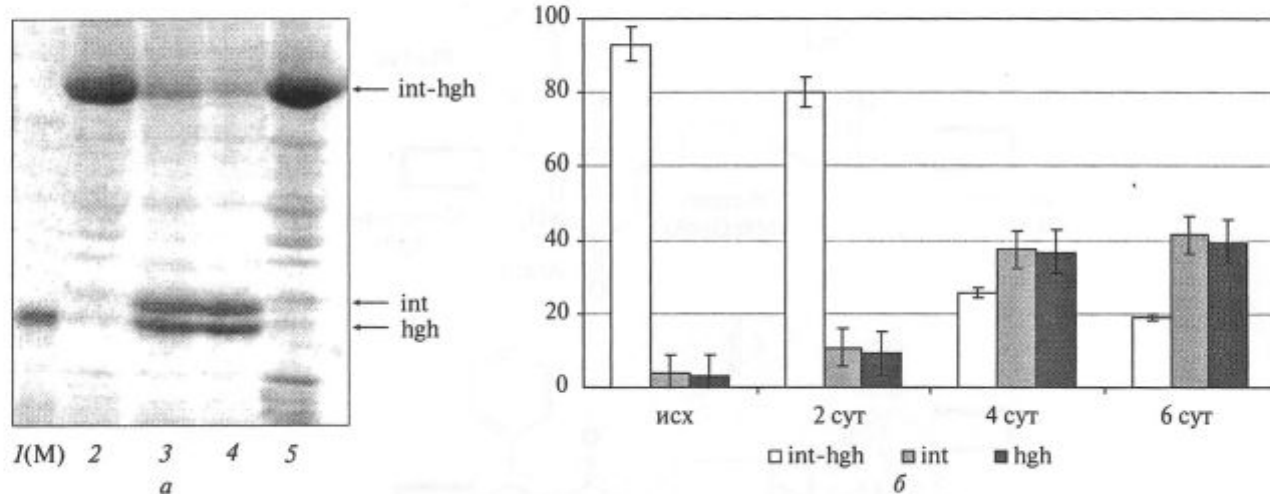


Рис. 3. Зависимость эффективности расщепления конструктора от времени инкубации: *a* — электрофореграмма образцов (рН 7,4, индуктор — 100 мМ β-меркаптоэтанол); *l* — маркер hgh; 2 — 2 сут инкубации; 3 — 4 сут инкубации; 4 — 6 сут инкубации; 5 — исходная проба до начала инкубации; *б* — график изменения во времени концентраций исследуемых белков (по вертикали, %), представленных на электрофорезе (исх — исходный образец)

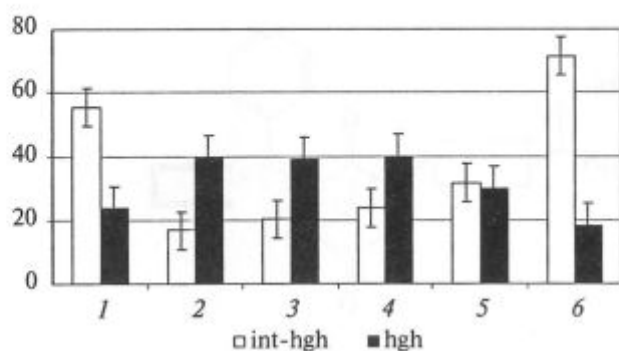


Рис. 4. Зависимость эффективности расщепления конструктора от вида индуктора (по вертикали, %). Время инкубации — 6 сут (здесь и далее — количество свободного интеина не представлено, так как оно эквивалентно количеству гормона роста человека (hgh)): 1 — контроль (без индуктора); 2 — 100 мМ β-меркаптоэтанол; 3 — 50 мМ ДТТ; 4 — 50 мМ восстановленный глутатион; 5 — 50 мМ цистеин; 6 — тиол-активированная сефароза

Экспериментальное изучение роли индукторов показало, что наиболее сильный эффект (до 60–80 % расщепления) вызывало добавление низкомолекулярных тиольных реагентов — β-меркаптоэтанол, ДТТ, восстановленного глутатиона. Значительно ниже была эффективность цистеина, а добавление тиопропил-сефарозы практически не влияло на расщепление (рис. 4). Применение для индукции расщепления SH-модифицированных сорбентов в целом пред-

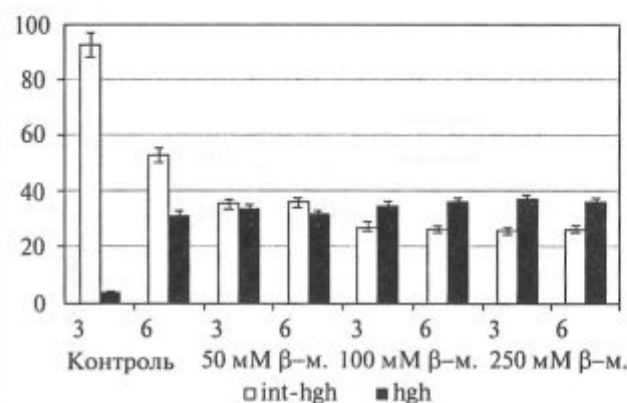


Рис. 5. Зависимость эффективности расщепления конструктора от концентрации β-меркаптоэтанола (по вертикали, %); по горизонтали — время инкубации, сут

ставляется интересным и оправданным, так как в этом случае тиольный реагент можно легко отделить от реакционной смеси фильтрованием или центрифугированием. Однако в нашем случае тиольная группа находилась на слишком коротком линкере (длина С-3) и, вероятно, не «дотягивалась» до N-концевого сайта расщепления, который, как известно [14], находится в глубине белковой глобулы. Для повышения эффективности твердофазной индукции SH-группа должна иметь значительно более длинный линкер, однако соответствующие исследования нами не проводились.

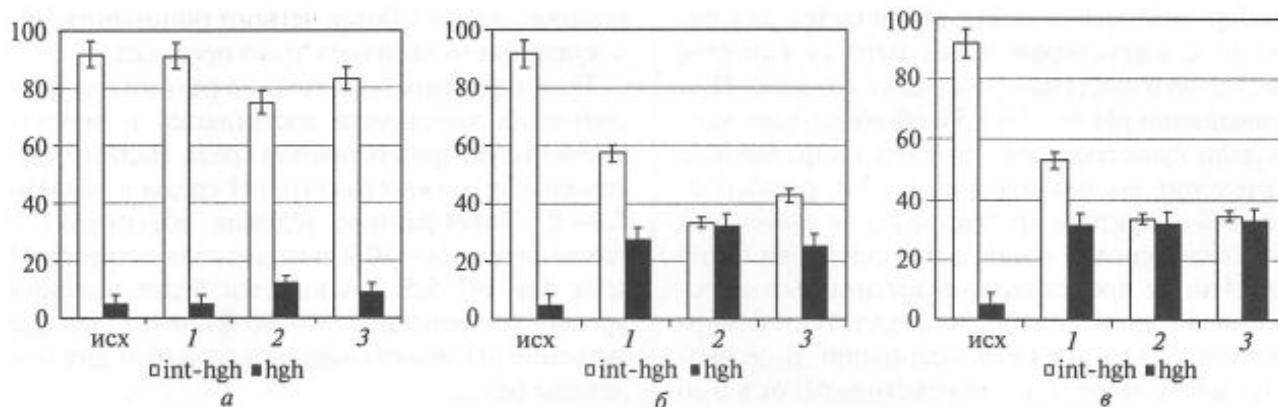


Рис. 6. Зависимость эффективности расщепления конструкта (по вертикали, %) от температуры инкубации (рН 7,4; 6 сут): а — 4 °С; б — 20 °С; е — 37 °С; исх — исходный образец, 1 — контроль; 2 — 100 мМ β-меркаптоэтанол; 3 — 50 мМ ДТТ

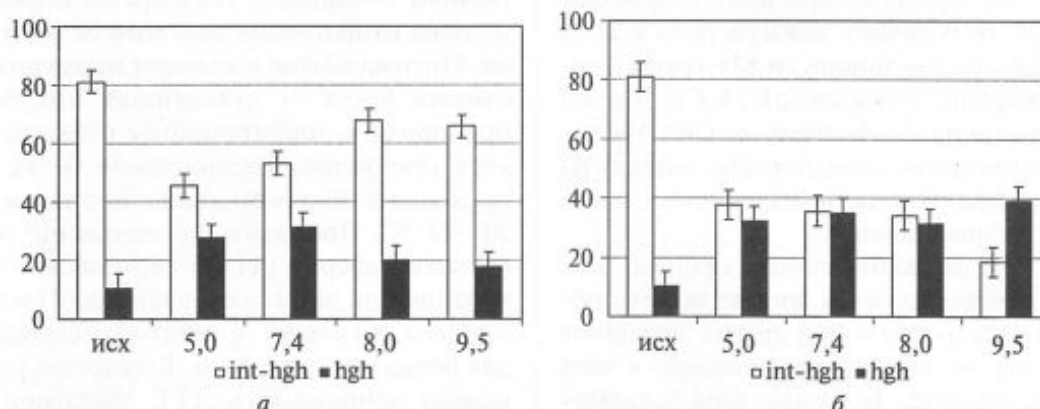


Рис. 7. Зависимость эффективности расщепления конструкта (по вертикали, %) от рН среды инкубации (по горизонтали) (исх — исходная проба): а — контроль; б — 100 мМ β-меркаптоэтанол

Следующим этапом работы была оценка влияния концентрации индуктора и температуры на эффективность расщепления. Оказалось, что повышение концентрации выше определенного значения не приводило к дальнейшему росту эффективности расщепления (рис. 5). Эксперименты также показали, что эффективность расщепления конструкта прямо зависит от температуры инкубации (рис. 6). В первые 3—4 сут инкубации быстро росли концентрации интеина и Ngh в присутствии индукторов расщепления, а количество исходного конструкта Int-hgh снижалось. К 6-м суткам процесс замедлялся и постепенно выходил на плато.

Полученные результаты говорят о том, что эффективность расщепления определяется не

только концентрацией индуктора, но и доступностью N-сайта расщепления. В пользу этого свидетельствует то, что повышение температуры от 4 до 20 °С резко повышало эффективность расщепления конструкта, а дальнейшее повышение температуры до 37 °С на процесс существенно не влияло (рис. 6). Вероятно, рост температуры повышает доступность N-сайта для индуктора за счет усиления лабильности глобулы белка-конструкта, однако повышение температуры выше 20 °С, вероятно, уже не сильно изменяет пространственную структуру конструкта.

Расщепление конструкта как результат ряда нуклеофильных перегруппировок зависит от кислотности среды, что было показано экспериментально (рис. 7). Мы обнаружили, что ха-

рактик этой зависимости различается для реакций с индуктором и без него (в качестве последнего выступал β -меркаптоэтанол). При повышении pH от 5 до 9,5 в обоих случаях наблюдали существенное, но разнонаправленное изменение выхода продуктов. Так, расщепление без индуктора протекало более эффективно в слабнокислой среде, а при повышении pH от 7,4 до 9,5 происходило снижение выхода реакции. Расщепление же в присутствии β -меркаптоэтанола ускорялось в основной среде, значительно усиливаясь при переходе pH от 8,0 до 9,5. Последний эффект можно довольно легко объяснить тем, что нуклеофильность групп, осуществляющих процесс расщепления конструктора (SH-группа β -меркаптоэтанола и цистеина, CONH_2 -группа аспарагина), возрастает с ростом pH. Безусловно, важную роль в этом играет и разница в основности SH-групп цистеина и β -меркаптоэтанола (pK_a 8,1 [15] и 9,6 [16] соответственно). Поэтому за счет увеличения реакционной способности молекулы индуктора эффективность отщепления в основной среде повышается.

В отсутствие меркаптоэтанола процесс расщепления химерного белка вполне может протекать наиболее активно при других значениях pH, поскольку механизмы расщепления в этих случаях различаются. Без индуктора отщепление N-экстеина обеспечивается только внутримолекулярными группами интеина. Здесь более важным может оказаться кислотный катализ некоторых этапов процесса расщепления, например, гидролиза тиоэфирной связи на N-конце интеина, что будет приводить к разрыву связи между N-экстеином и интеином. Как известно из литературы, расщепление на N-конце стимулирует протекание разрыва пептидной связи между интеином и C-экстеином [3]. К тому же практически каждый этап процесса расщепления с химической точки зрения является равновесным и имеет свое оптимальное значение pH. Поэтому при разных pH лимитирующими стадиями могут быть разные реакции. В итоге оптимальной для расщепления конструктора без индуктора оказывается слабнокислая среда, а в присутствии меркаптоэтанола процесс расщепления наиболее эффективен при основных значениях pH. Дальнейшее изучение зависимости интеин-опосредованного расщепления от pH

поможет достичь более четкого понимания молекулярных механизмов этого процесса.

Таким образом, наилучшие результаты расщепления конструктора достигаются в присутствии индуктора в основной среде. Видимо, оптимальным можно считать pH среды в области 7,4–8. Подобранные условия обеспечивали расщепления 60–80 % исходного конструктора. И хотя при pH 9,5 наблюдается более высокий уровень расщепления (80–90 %), такое высокое значение pH может оказаться опасным для молекулы белка.

Выводы. Экспериментально показано, что созданный нами химерный белок Int-hgh эффективно расщепляется, и это дает возможность получить гормон роста человека с нативным N-концом. Подобраны оптимальные условия отщепления целевого белка от интеина. Оптимальным временем индукции можно считать 6 сут — дальнейшая инкубация не приводила к значительному повышению выхода продуктов. Расщепление белка хорошо проходит в широком диапазоне температур — 20–37 °С. Проводить расщепление рекомендуется в буфере с pH 7,5–8,0, так как хотя инкубация при высоких значениях pH и ускоряет процесс, но может привести к нежелательным для белка последствиям. В качестве индуктора можно использовать ДТТ, глутатион или β -меркаптоэтанол, однако последний выгодно отличается более высокой стабильностью при хранении. Интересно, что повышение концентрации β -меркаптоэтанола выше 100 мМ нецелесообразно, так как к усилению расщепления не ведет. Подобранные условия обеспечивали расщепления 60–80 % исходного конструктора, что позволяет использовать эту методику для получения гормона роста человека в коммерческих целях.

SUMMARY. Protein splicing is a post-translational autocatalytic process that results in excision of internal peptide (intein) from a precursor protein and the ligation of the flanking protein sequences (exteins). High specificity of the intein-mediated excision of protein precursors allows the use of protein splicing in biotechnology. This work was aimed at the obtaining of human growth hormone with a native N-terminus in *E. coli*. Chimerical protein consisting of a short N-terminal peptide, Mxe GyrA intein and human growth hormone was created. During the translation formyl-methionine modified N-terminal peptide

should have been removed by splicing. Intein was shown to mediate the cleavage of exteins, but their subsequent ligation was not observed. That allowed the preparation of human growth hormone with a native N-terminus. The effect of various factors on cleavage efficiency was studied. The most efficient cleavage of chimeric protein (60–80 %) was achieved in the presence of inductor (100 mM β -mercaptoethanol) upon the incubation for 4–6 days.

РЕЗЮМЕ. Білковим сплайсингом називають пост-трансляційне автокаталітичне видалення внутрішньої білкової послідовності (інтеїну) з наступним лігуванням фланкуючих пептидів (екстеїнів). Висока специфічність розщеплення білків-попередників, що забезпечується інтеїнами, дозволяє використовувати білковий сплайсинг у біотехнологічних цілях. Мета роботи полягала в отриманні у клітинах *E. coli* рекомбінантного фактору росту людини з нативним N-кінцем. Для цього було створено химерний білок, що складався з короткого N-кінцевого пептиду, інтеїну Mxe GyrA та гормону росту людини. В процесі трансляції формілметіоніном модифікується N-кінцевий пептид, який далі видаляється при сплайсингу. Було показано, що інтеїн забезпечує відщеплення екстеїнів, але наступного їх лігування не відбувається. Це дозволило отримати гормон росту людини з нативним N-кінцем. Вивчено вплив різних факторів на ефективність розщеплення. Встановлено, що найефективніше розщеплення химерного білка (60–80 %) досягається при додаванні індуктора (100 мМ β -меркаптоетанолу) та інкубації протягом 4–6 діб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Datta B.* MAPs and POEP of the roads from prokaryotic to eukaryotic kingdoms // *Biochimie.* — 2000. — 82. — P. 95–107.
2. *Wood D.* Simplified protein purification using engineered self-cleaving affinity tags // *J. Chem. Tech. Biotech.* — 2003. — № 78. — P. 103–110.
3. *Chong S., Montello G., Zhang A., Cantor E., Liao W., Xu M., Benner J.* Utilizing the C-terminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step // *Nucl. Acids Res.* — 1988. — 26, № 22. — P. 5109–5115.
4. *Kane P.M., Yamashiro C.T., Wolczyk D.F., Neff N., Goebel M., Stevens T.H.* Protein splicing converts the yeast TFP1 gene product to the 69 kDa subunit of the vacuolar H⁺-adenosine triphosphatase // *Science.* — 1990. — 250. — P. 651–657.
5. *Yu R., Hong A., Dai Y., Gao Y.* Intein-mediated rapid purification of recombinant human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide // *Acta Biochim. Biophys. Sin.* — 2004. — 36, № 11. — P. 759–766.
6. *Старокадомский П.Л.* Белковый сплайсинг // *Укр. биохим. журн.* — 2005. — № 4. — С. 14–29.
7. *Noren C., Wang J., Perler F.* Dissecting the chemistry of protein splicing and its applications // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2000. — 39. — P. 450–466.
8. *Маниатис Т., Фрич Э., Сенбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
9. *Novagen pET System Manual.* 11th Ed. EMD Biosciences, Darmstadt, Germany, 2005. — 80 p.
10. *Аффинная хроматография: Методы /* Под ред. П. Дина, У. Джонсона, Ф. Мидла. — М.: Мир, 1988. — С. 98–99.
11. *Westermeier R.* Electrophoresis in practice. — Weinheim: VCH, 1997. — 331 p.
12. *Telenti A., Southworth M., Alcaide F., Daugelat S., Jacobs W.R., Perler F.B.* The *Mycobacterium xenopi* GyrA protein splicing element: characterization of a minimal intein // *J. Bacteriol.* — 1997. — 179, № 20. — P. 6378–6382.
13. *Perler F.* InBase, the intein database // *Nucl. Acids Res.* — 2002. — 30. — P. 383–384.
14. *Klabunde T., Sharma S., Telenti A., Jacobs W., Sacchetti J.* Crystal structure of GyrA intein from *Mycobacterium xenopi* reveals structural basis of protein splicing // *Nature Struct. Biol.* — 1998. — 5, № 1. — P. 31–36.
15. *Рабинович В.А., Хавин З.Я.* Краткий химический справочник. 2-е изд. — Л.: Химия, 1978. — 240 с.
16. *Brocklehurst K., Stuchbury T., Malthouse J.* Reactivity of neutral and cationic forms of 2,2'-dipyridyl disulfide towards thiolate anions // *Biochem. J.* — 1979. — 183. — P. 233–238.

Поступила 28.04.06