УДК 579.69-619:616.988 :616-076

РЕНАТУРАЦІЯ РЕКОМБІНАНТНОГО БІЛКА SpaA З ТІЛЕЦЬ ВКЛЮЧЕННЯ *Escherichia coli* МЕТОДОМ ІММОБІЛІЗАЦІЙНОЇ МЕТАЛАФІННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

О.Б. Горбатюк, *аспірант**
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

О.М. Дерябін, *завідувач лабораторії*
Інститут ветеринарної медицини НААН України

Проведено дослідження з оптимізації схеми ренатурації рекомбінантного білка SpaA(tr) *Er. rhusiopathiae*. Розроблено ефективну схему його одержання в очищеному і розчинному стані із тілець включення ренатурацією на металафінному сорбенті. Функціональну активність ренатурованого білка підтверджено за контрольного зараження високопатогенним штамом *Er. rhusiopathiae* мишей, які були щеплені рекомбінантним білком.

Вступ. Технології рекомбінантних ДНК дозволяють клонувати цільові гени і забезпечувати їхню експресію в клітинах відповідних продуцентів. Це дозволяє отримувати препаративні кількості білків, які є важливими для структурних досліджень, діагностики, терапії та імунопрофілактики [1,2].

На сьогодні розроблено високопродуктивні системи експресії, які в стандартних умовах ферментації забезпечують суперсинтез рекомбінантних білків до 30 % від сумарних білків клітини. Висока ефективність експресії клонованого гена досягається використанням плазміди, яка містить сильний промотор бактеріофага Т7, і відповідного штаму-реципієнту *Escherichia coli*. Однак суперпродукція гетерологічних білків часто супроводжується їх агрегацією – утворенням і накопиченням у нерозчинному та неактивному стані у вигляді тілець-включень [4]. Процес отримання функціонально активних рекомбінантних білків, ренатурацією *in vitro* з бактеріальних тілець включення, містить чотири етапи: виділення тілець включення, солюбілізацію, ренатурацію та очищення отриманого продукту.

Незважаючи на досить успішне проходження перших двох етапів, сам процес ренатурації залишається емпіричним і у випадку індивідуальних білків потребує оптимізації *de novo*. У зв'язку з цим розробка універсальних, технологічних, ефективних та недорогих схем ренатурації рекомбінантних білків з тілець включення є особливо актуальною. Для білків, які містять генно-інженерно введену послідовність олігогістидину (His-tag), привабливою є стратегія ренатурації на хроматографічній колонці [5, 6].

*Науковий керівник - академік НАМН України В.А. Кордюм.

Іммобілізація солюбілізованого із тілець включення білка на металафінному сорбенті через послідовність His-tag дозволяє проводити очищення і ренатурацію паралельно. Ренатурація білка досягається за рахунок контрольованого зниження концентрації денатуруючого реагенту і може бути оптимізована шляхом варіювання складу буферу для ренатурації та параметрів хроматографічного процесу.

Мета роботи полягала в оптимізації схеми ренатурації рекомбінантного білка SpaA(tr) *Erysipelothrix rhusiopathiae* на металафінній колонці для його отримання у розчинній і функціонально активній формі.

Матеріали і методи досліджень. Для продукування SpaA(tr) [3] було використано модифікований протокол аутоіндукції [7]. Після закінчення культивування, осаджені центрифугуванням клітини продуцента суспендували в буфері ТЕ (20 мМ трис-HCl (pH 8.0), 1 мМ ЕДТА), який містив 1 мг/мл лізоциму ("Sigma" США), і інкубували 20 хв на льоду. Для руйнування хромосомної ДНК одержаний клітинний лізат обробляли ультразвуком та ДНКазою (5 мг/дм^3); фракцію нерозчинних білків виділяли центрифугуванням (10000 g, 20 хв). Для частково-го очищення тілець включення використовували декілька послідових промивань буфером ТЕ з 0,5 % дезоксихолатом натрію. Одержані тільця включення зберігали при -70°С. Електрофорез білків проводили в 12 % ДСН-ПААГ за методом [9]. Оцінку вмісту (в %) білків проводили методом денситометрії електрофореграм з наступним аналізом їх програмою "TotalLab". Як стандарт для побудови калібрувальної кривої використовували БСА ("Fermentas" Литва) з відомою концентрацією.

Детектування накопичення SpaA(tr) в бактеріальні тільця включення проводили методом імуноблотингу білків на нітроцелюлозній мембрані Hybond-C Extra ("Amersham Biosciences" Швеція). Після блокування місць неспецифічного зв'язування буфером PBS з 3% знежиреного молока (PBSM), мембрану з іммобілізованими білками інкубували протягом години з розведеними у 20 разів буфером PBSM гіперімунною сироваткаю мурчаків на штам "1933" (серотип 1б) бактерії *Er. rhusiopathiae*. В якості негативного контролю для ІФА використали сироватку крові неімунізованих мурчаків. Для проявлення мембрани використовували кон'югат з пероксидазою хрону (Anti-Guinea Pig IgG conjugate) ("Sigma") та субстрат 4-хлоро-1-нафтол ("Sigma").

Для очищення та ренатурації рекомбінантного білка SpaA(tr) методом IMAX тільця включення солюбілізували в буфері 20 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 6 М гуанідин-HCl, 100 мМ Na_2HPO_4, 10 мМ імідазол, 10 мМ 2-меркаптоетанол протягом 1 год при кімнатній температурі, та фільтрували через 0,45 мкм PVDF мембранний фільтр ("Millipore"). Для оптимізації умов очищення і ренатурації рекомбінантних білків 1 см^3 HiTrap chelating колонку урівноважували йонами Ni^{2+} та під'єднували до автоматизованої хроматографічної системи FPLC ("Pharmacia"), урівноважували буфером PBS (pH 8.0), який містив 8 М сечовину, 10 мМ імідазол (насос А) при швидкості потоку буфера 0,5 см^3/хв. 1 см^3 солюбілізованих тілець включення (2 мг/см^3) наносили на колонку зі швидкістю 0,2 см^3/хв. та промивали колонку. Ренатурацію білків проводили в результаті встановлення лінійного градієнта сечовини в 15 об'ємах колонки при змішуванні буферів з насосу А, який містив сечовину та ренатуруючого буфера з насосу В (PBS, pH 8,0, який містив 10 мМ імідазол) при швидкості потоку через колонку 0,2 см^3/хв. Ренатуровані білки елюювали з колонку буфером для ренатурації, який містив 0,3 М імідазол. Масштабування процесу ренатурації проводили з вико-

ристанням 26/20 XK колонки ("GE Healthcare"), в яку спаковували 20 см³ Ni-NTA Superflow агарози ("Qiagen"). Ренатурацію проводили у системі вищеописаних реагентів у 200 см³ лінійному градієнті сечовини при швидкості потоку буфера 2,7 см³/хв. Відповідні фракції елюції збирали та аналізували в 12 % ДСН-ПААГ. Чистоту білків та вихід ренатурації визначали методом денситометрування електрофореграм.

Ексклюзійну хроматографію (SEC) для фракціонування білків проводили на колонці Superdex-75 (10/300) GL ("Amersham Biosciences") з використанням автоматизованого хроматографа FPLC ("Amersham Biosciences"). Сорбент урівноважували фосфатно-сольовим буфером (PBS), швидкість потоку елюенту при проведенні хроматографії складала 0,2 см³/хв. Калібрування колонки проводили сумішшю білків-маркерів з відомою молекулярною масою.

Оцінку функціональної активності ренатурованого білка SpaA(tr) здійснювали методом вестерн-блоту з гіперімунною сироваткою мурчаків на вакцинний штам "1933" (серотип 1б) бактерії *Er. rhusiopathiae* та в дослідах по контрольному зараженні високопатогенним штамом *Er. rhusiopathiae* вакцинованих рекомбінантним білком SpaA(tr) мишей.

Результати та їх обговорення. Для експресії білка SpaA(tr) використовували рекомбінантну плазміду pSpaA(tr), яка містить промотор одного з раніх генів бактеріофага T7 і штам реципієнт BL21(DE3). В даному штамі ген РНК-полімерази фага T7 знаходиться під контролем лактозного оперону. Індукування експресії проводили за протоколом аутоіндукції, який передбачає використання неорганічних солей, гліцеролу, глюкози та лактози як індуктора експресії. Така система експресії не вимагає дорогих культуральних середовищ та спеціального об-

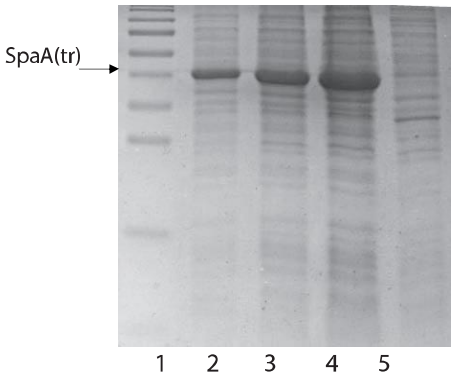

Рис. 1. Аналіз експресії SpaA(tr) в E.coli BL21(DE3) із плазмідою pSpaA(tr) (аутоіндукція):

1 – білки-маркери молекулярної маси (130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15 кДа); 2–4 – фракція сумарних білків клітини після індукування експресії SpaA(tr); 5 – фракція сумарних білків клітини, при культивуванні в середовищі без індуктора експресії. На доріжки 2–4 нанесено білки, виділенні з 0,0025, 0,005 та 0,01 см³ суспензії бактеріальних клітин.

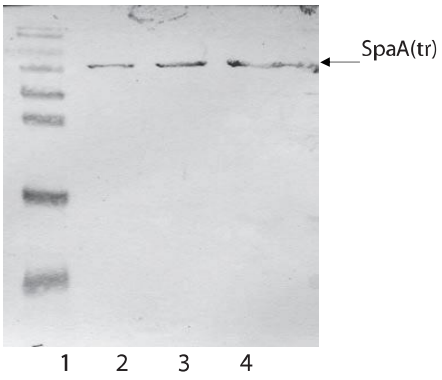

Рис. 2. Імуноблотинг фракції нерозчинних білків клітини (тільця включення), після індукування експресії SpaA(tr) в E. coli BL21(DE3) з плазмідою pSpaA(tr):

1 – білки-маркери молекулярної маси (70, 55, 40, 35 кДа) "Prestained Protein Ladder" (Fermentas); 2–4 – тільця включення виділенні відповідно з 0,0025, 0,005 та 0,01 см³ культури *E.coli*.

ладнання, а пролонгований час культивування (до 24 год) забезпечує максимальні виходи рекомбінантного білка [7]. Електрофоретичний аналіз лізатів бактеріальних клітин показав наявність в них білка SpaA(tr), очікуваної молекулярної маси (47 кДа), рівень експресії, якого відносно сумарних білків клітини становив близько 30 % (600 мг білка SpaA(tr) на 1 дм^3 бактеріальної культури) (рис. 1).

Методом вестерн-блот аналізу було встановлено, що білок SpaA(tr) накопичувався у вигляді бактеріальних тілець включення (рис. 2). Тому необхідною умовою для проведення подальших досліджень, було отримання препаративних кількостей розчинного білка у функціонально активній формі ренатурацією *in vitro*.

Оскільки SpaA(tr) містить генетично введену полідовність His-tag, було використано стратегію його очищення та ренатурації на металафінній колонці. Принцип методу базувався на тому, що рекомбінантний білок солюбілізували з тілець включення розчином, який містив високу концентрацію сечовини та іммобілізуали на металафінному сорбенті. Ренатурація іммобілізованого білка забезпечувалась в результаті градієнтного зниження концентрації сечовини (від 8М до 0М сечовини). Білок елюювали в нативних умовах буфером, який містив імідазол (рис. 3А).

Було досліджено вплив різних концентрацій імідазолу (50, 100, 300, 500 мМ) в буфері для елюції на повноту елюції білків з колонки. Показано, що елюція SpaA(tr) з колонки відбувається при 100 мМ концентрації імідазолу. Чистота білка становила понад 90% (рис. 3Б).

У процесі ренатурації багатьох рекомбінантних білків формуються розчинні, але не активні агрегати, які значно знижують вихід функціонального продукту [9]. Аналіз вмісту розчинних агрегатів проводили методом ексклюзій-

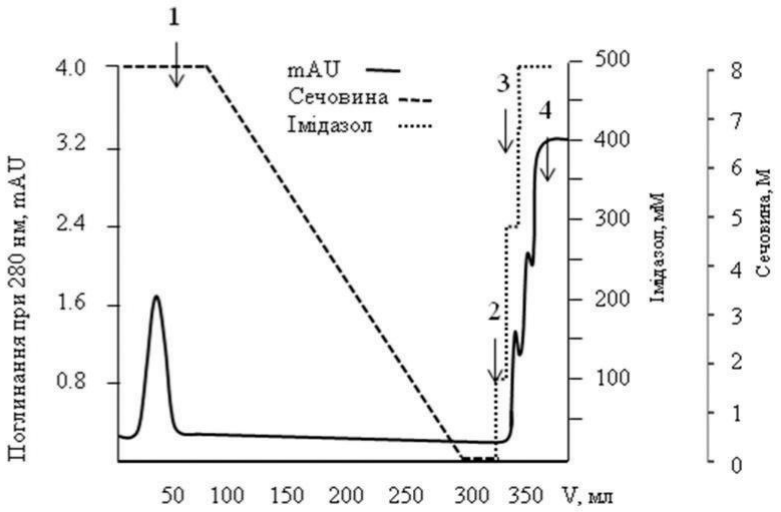

Рис. 3 А. Хроматограма очищення та ренатурації SpaA(tr) на 26/20 XK колонці, яка містила 20 см^3 Ni-NTA Superflow агарози:

1 – білки солюбілізовані з тілець включень, що наносились на колонку; 2 – білки, які видаляються при промиванні колонки буфером, який містить сечовину; 3,4 – ренатурований білок отриманий елюцією 50, 100, 300, 500 мМ імідазолом відповідно.

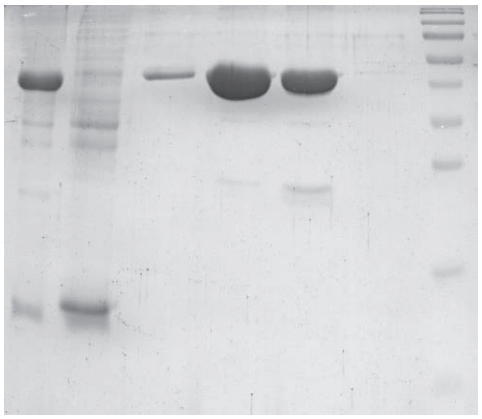

Рис 3 Б. Електрофореграма очищення та ренатурації SpaA(tr) на металафінній колонці:

1 – очищені та солюбілізовані тільця включення, які наносили на колонку (на доріжку нанесено 0,002 см^3); 2 – білки, які не зв'язались із сорбентом і видаляються за промивань буфером (на доріжку нанесено 0,002 см^3); 3–6 – білки отримані елюцією 50, 100, 300, 500 мМ імідазолом відповідно (на доріжку нанесено 0,02 см^3 елюату); 7 – білки маркери молекулярної маси (130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15, 10 кДа).

ної хроматографії. В результаті розділення ренатурованого SpaA(tr) на колонці Superdex 75 10/300 було отримано одну фракцію білків, електрофоретичним аналізом якої було підтверджено, що SpaA(tr) елююється як мономер (рис. 4). Також було встановлено концентрацію солюбілізованого з тілець включення SpaA(tr), а саме 1–1,5 мг SpaA(tr)/см^3 металафінного сорбенту, яка є оптимальною для проведення ренатурації.

Важливою характеристикою ефективності проходження ренатурації є вихід ренатурації, який розраховували за співвідношенням кількості виділеного в розчинній формі SpaA(tr) після його очищення та ренатурації до його вихідної кількості в тільцях включення. Узагальнені дані по результатах експресії, очищення та ренатурації білка SpaA(tr) наведено в табл. 1 та на рис. 5.

Отриманий білок був розчинним та функціонально активним протягом року в умовах його зберігання при +4°С в буфері для елюції.

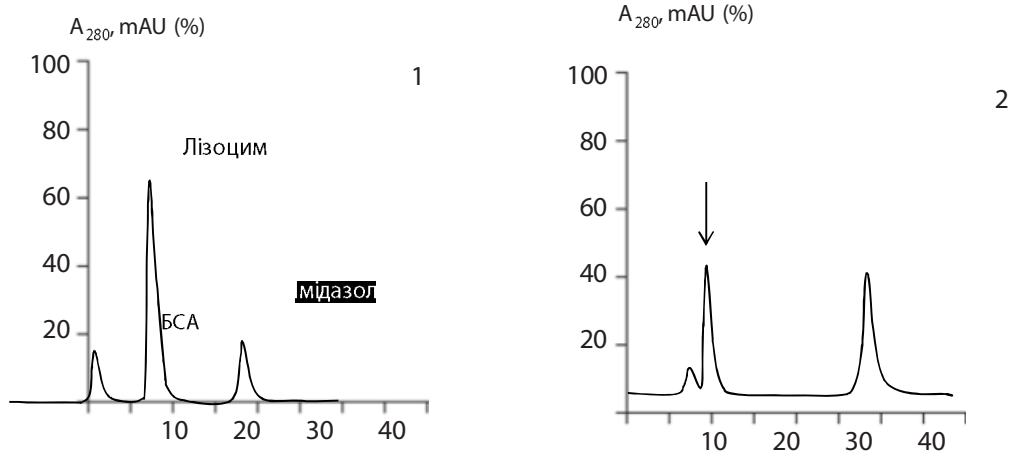

Рис. 4. Аналіз вмісту агрегатів у фракціях ренатурованого SpaA(tr) на гельфільтраційній колонці Superdex–75 (10/300) GL:

1 – калібрувальна крива (як стандарти молекулярної маси для калібрування колонки було використано: бичачий сироватковий альбумін – 68.0 кДа, лізоцим курячих яєць – 14 кДа, імідазол – 68 Да); 2 – профіль елюції отриманого ренатурацією на металафінній колонці SpaA(tr).

Таблиця 1. Експресія, очищення та ренатурація білка SpaA(tr)

1	Вихід цільового білка (мг / дм^3 *E. coli*)	630
2	Рівень експресії цільового білка від тотальних білків *E. coli*, %	32
3	Значення OD_{600} після індукції	18
4	Вихід білка після виділення та очищення тілець включення, %	90
5	Чистота тілець включення, %	41
6	Вихід білка з тілець включеня після його очищення та ренатурації, %	92
7	Чистота після ренатурації, %	93

Функціональну активність ренатурованого і очищеного SpaA(tr) визначали в дослідах на білих мишах масою 19±1 г, щеплених з інтервалом в 2 тижні рекомбінантним білком двічі, з використанням ад'юванта Фрейнда. У подальшому проводили зараження через 14 днів після щеплення патогенними для мишей бактеріями бешихи контрольного штаму "149" підшкірно, в дозі 0,2 см^3 (100 LD50). Як контрольну групу використовували мишей, котрим уводили стерильний МПБХ.

Після контрольного зараження загибель мишей з ознаками гострої септицемії спостерігали в контрольній групі протягом 3–5 діб. Препарат, виготовлений із застосуванням ад'юванту та ренатурованого і очищеного SpaA(tr), в концентрації 10 мкг, після дворазового щеплення забезпечив захист тварин на 100 % (табл. 2).

Висновки

Оптимізовано експресію рекомбінантного білка SpaA(tr) в *E. coli* та розроблено ефективну схему його одержання в очищеному і розчинному стані з тілець включення ренатурацією на металафінному сорбенті. Зазначені умови забезпечили високий вихід розчинного (понад 90%) та функціонально активного рекомбінантного білка.

Функціональну активність ренатурованого SpaA(tr) було підтверджено при контрольному зараженні високопатогенним штамом "149" *Er. rhusiopathiae* мишей, які були щеплені двічі рекомбінантним білком. Ренатурований SpaA(tr) в дозі 6–10 мкг забезпечив захист тварин на 100%.

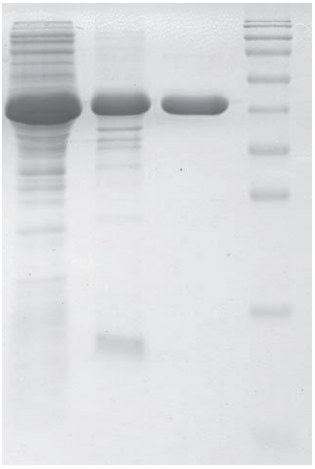

Рис. 5. Експресія та очищення білка SpaA(tr):

1 – фракція тотальних білків клітини після індукування експресії SpaA(tr) в E.coli BL21(DE3) із плазмідою pSPAA(tr); 2 – очищені та солюбілізовані тільця включення; 3 – очищений розчинний SpaA(tr) отриманий ренатурацією на металафінній колонці; 4 – білки-маркери молекулярної маси: 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15, 10 кДа (на доріжку нанесено 15 мкл проби).

Показано перспективність використання запропонованого нами підходу для одержання препаративної кількості очищених функціонально активних рекомбінантних 6 His-tag білків із тілець включення.

Таблиця 2. Характеристика імуногенних властивостей рекомбінантного білку SpaA(tr) при контрольному зараженні щеплених білком мишей високопатогенним штамом *Er. rhusiopathiae*

Група кількість тварин, (n=10)	Вміст (кількість) білка SpaA(tr) для щеплення мишей	Доза для зараження 40 LD_{50} (мікробних клітин)	Загинуло всього		Захист (%)
			голів	%	
1	10 мкг	4×10^4	-	-	100
2	2,5 мкг	4×10^4	5	50	50
3	0,63 мкг	4×10^4	7	70	30
4	Контроль, не щеплені	4×10^4	10	100	–

Література

1. Alibolandi M., Mirzahoseini H. Chemical assistance in refolding of bacterial inclusion bodies // American Journal of Biochemistry and Molecular Biology. – 2011. – **1**(3). – P. 310–318.
2. Amulya K. Bioprocessing of Therapeutic Proteins from the Inclusion Bodies of *Escherichia coli* // Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. – 2003. – **85**. – P. 43–93.
3. Дерябин О.Н., Дерябина Е.Г., Гильчук П.В. Клонирование и экспрессия гена SPAA *Erysipelothrix rhusiopathiae* в *Escherichia coli* // Biopolymers and Cell. - 2011. – **27**, №4. – P. 310–313.
4. Fahnert B., Lilie H., Neubauer P. Inclusion bodies: formation and utilization // Adv. Biochem Eng Biotechnol. – 2004. – **89**. – P. 93–142.
5. Li M., Su Z.G., Janson J.C. In vitro protein refolding by chromatographic procedures // Protein Expr. Purif. – 2004. – **33**, №1. – P. 1–10.
6. Liu M., Wang X, Yin C, Zhang Z One-step on-column purification and refolding of a single-chain variable fragment (scFv) antibody against tumour necrosis factor alpha // Biotechnol. Appl. Biochem. – 2006. – **43**. – P. 137–145.
7. Studier F.W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures // Protein Expr. Purif. – 2005. – **41**(1). – P. 207–234.
8. Wang W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics // Int. J. Pharm., 2005. – **289**, №1–2. – P. 1–30.
9. Westermeier R. Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations // Weinheim: VCH, 1997. – P. 331.

АННОТАЦИЯ

Горбатюк О.Б., Дерябин О.Н. *Ренатурация рекомбинантного белка SpaA из телец включения Escherichia coli методом иммобилизационной металлаффинной хроматографии // Биоресурсы и природопользование. – 2012. – **4**,№ 1–2. – С. 10–16.*

Проведены исследования по оптимизации схемы ренатурации рекомбинантного белка SpaA(tr) Er. rhusiopathiae. Разработана эффективная схема его получения в очищеном и растворимом состояний из телец включения ренатурацей на металлаффинном сорбенте. Функциональная активность ренатурированого белка подтверждена при контрольном заражении высокопатогенным штаммом Er. rhusiopathiae мышей, которые были иммунизированы рекомбинантным белком.

SUMMARY

O. Gorbatiuk, O. Deriabin. *Renaturation of SpaA recombinant protein from Escherichia coli inclusion bodies by immobilizing metal affine chromatography // Biological Resources and Nature Management. – 2012. – **4**, № 1–2. – P. 10–16.*

Studies of the optimization of Er. rhusiopathiae recombinant protein SpaA(tr) renatuation scheme were performed. Effective scheme of its obtaining in purified and soluble form from inclusion bodies by renaturation on metal affine sorbent has been developed. Functional activity of renaturated protein was confirmed at control infection by highly pathogenic Er. rhusiopathiae strain of mice immunized with the recombinant protein.