

УДК 616.36:578.891

ОДЕРЖАННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО АНАЛОГА БІЛКА p24 ВІРУСУ BLV

А. М. Коновалова

Ю. О. Кобозєв

Н. І. Грабченко

Л. О. Ганова

АТЗТ Науково-виробнича компанія «Діапроф-Мед», Київ

E-mail: kon_anna@ukr.net

Розроблено високоефективну технологію одержання рекомбінантного аналога білка p24 вірусу бичачої лейкемії з підтвердженими методом імуноферментного аналізу (ІФА) антигенними властивостями. У процесі досліджень відібрано найкращий штам-реципієнт *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIL для інтродукції рекомбінантної плазмиди, оптимізовано склад живильного середовища для культивування продуцента. Розроблено методику проведення металохелатафінного хроматографічного очищення та рефолдингу рекомбінантного білка. Як критерій для оцінки ефективності кожного етапу застосовували ІФА, за допомогою якого контролювали антигенні характеристики рекомбінантного білка. Встановлено, що вид штаму-продуцента та склад живильного середовища впливають на продуктивність і розподіл рекомбінантного білка у клітині між цитоплазматичною та нерозчинною фракціями. Розроблена технологія дає змогу одержувати препарати білка зі ступенем чистоти 98% та поліпшеними антигенними властивостями, що дозволяє використовувати його для підвищення специфічності та чутливості імуноферментних діагностичних тест-систем для виявлення збудника бичачої лейкемії.

Ключові слова: вірус бичачої лейкемії, білок p24, *Escherichia coli* BL21(DE3), металохелатафінна хроматографія, рефолдинг, імуноферментний аналіз.

Однією з актуальних проблем тваринництва є лейкоз великої рогатої худоби (БРХ), етіологічним агентом якого є онкоретровірус бичачої лейкемії (bovine leukemia virus — BLV) [1]. Вчасне виявлення збудника бичачої лейкемії BLV має вирішальне значення для запобігання поширенню цього захворювання, особливо в умовах утримання тварин у великих тваринницьких господарствах. Імуноферментний аналіз (ІФА) вирізняється з-поміж інших серологічних методів високою специфічністю, ефективністю, простотою та легкістю поставлення.

Останнім часом у діагностичних тест-системах широко використовують рекомбінантні аналоги антигенів збудників, синтезованих у клітинах *Escherichia coli*, оскільки для одержання нативного вірусного білка потрібно розмножити вірус у культурі клітин, що є дуже дорогим і громіздким методом, а в разі з патогенами людини — ще й потенційно небезпечним [2]. Коровий (серцевинний) білок BLV p24 є одним із найбільш імуногенних, тому його часто використовують як антиген в ІФА-тест-системах для виявлення збудника BLV-інфекції [3].

Метою даної роботи було дослідження впливу умов біосинтезу рекомбінантного

аналога білка p24 BLV у різних штаммах *E. coli* на його антигенні характеристики.

Матеріали і методи

Бактеріальні штами та плазмиди. У роботі було використано такі штами-реципієнти з музейної колекції штамів НВК «Діапроф-Мед»: *Escherichia coli* BL21(DE3) [*E. coli* B F⁺ompT HsdS_B(r_B-m_B⁻) gal dcm λ (DE3)], *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIL [*E. coli* B F⁺ompT HsdS_B(r_B-m_B⁻) gal dcm λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]], *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RP [*E. coli* B F⁺ompT HsdS_B(r_B-m_B⁻) gal dcm λ (DE3) endA Hte [argU proL Cam^r]], *E. coli* BL21 AI [*E. coli* B F⁺ompT HsdS_B(r_B-m_B⁻) gal dcm ara B:T7 RNAP-tet A].

Одержання компетентних клітин та їх трансформацію здійснювали за стандартною схемою з використанням 0,1М CaCl₂ [4]. Для трансформації застосовували рекомбінантну плазмиду, створену на основі експресійного вектора pET24a шляхом клонування фрагмента гена *gag*, який кодує білок p24 BLV. Експресія рекомбінантного білка контролюється промотором бактеріофага T7. Як генетичний маркер плазмиди містить ген стійкості до канаміцину.

Трансформовані плазмідним вектором культури висівали на чашки Петрі з агаризованим (1,5%) середовищем *LB*, що містило в кінцевій концентрації 25 мкг/мл канаміцину, а в разі використання реципієнтів *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIL та *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RP — 17 мкг/мл хлорамфеніколу.

Умови культивування. Для вирощування штамів-продуцентів використовували стандартні середовища *LB*, *TB*, *2YT* [4] та *M4* (сольова основа *M9* [4] з додаванням глюкози до кінцевої концентрації 0,5%, казамінові кислоти до кінцевої концентрації 1%). В усі середовища додавали канаміцин у кінцевій концентрації 50 мкг/мл та хлорамфенікол («КиївМедПрепарат», Україна; для штамів *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIL та *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RP) — у кінцевій концентрації 34 мкг/мл. Культури вирощували на шутель-апараті за умов інтенсивного перемішування (180 об/хв) при температурі 37 °C, контролюючи значення оптичної густини культури за допомогою спектрофотометра марки DR5000 (Lange, Німеччина). Для запуску механізму біосинтезу рекомбінантного білка в середовище вносили індуктор IPTG (ізопропіл- β -D-1-тіо-галактопіранозид) до кінцевої концентрації 1мМ при оптичній густині OD_{600} 0,3 од. З метою індукування експресії цільового білка у штамі *E. coli* BL21 AI окрім IPTG додавали арабінозу до кінцевої концентрації 0,2%. Ферментацію проводили за тих самих умов упродовж 3,5 год для накопичення цільового рекомбінантного білка в бактеріальних клітинах.

Лізис біомаси. Після завершення ферментації одержану біомасу осаджували центрифугуванням (10 000g, 15хв) та заморожували при -70 °C. Розморожену в умовах кімнатної температури біомасу ресуспендували в буфері для лізису (трис-цитрат 50 мМ, Na_2 -EDTA 1 мМ, фенілметилсульфонілфлуорид 1 мМ, тритон X-100 0,1%) на гомогенізаторі Polytron PT 3 000 (Kinematica AG, Швейцарія) та обробляли ультразвуком за допомогою дезінтегратора УЗДН-А (SELMI, Україна) серією із 6 імпульсів по 10 с. Вносили до суспензії лізоцим до кінцевої концентрації 0,2 мкг/мл та інкубували 1,5 год при 37 °C. Для гідролізу хромосомної ДНК додавали до суспензії розчин ДНК-ази-I до кінцевої концентрації 6 од/мл та розчин $MgSO_4$ до кінцевої концентрації 1мМ. Інкубували 1 год при 37 °C. Фракцію розчинних білків відокремлювали центрифугуванням (10 000g, 25 хв) від нерозчинної фракції, що містила тільки

включення, які розчиняли в буфері із сечовиною (трис-HCl, pH 8,0 — 20 мМ, NaCl — 0,5 М, імідазол — 20 мМ, 2-меркаптоетанол — 1 мМ, сечовина — 8 М). Сумарний денатурований білок одержували шляхом додавання сечовини до первинного лізату (що містить тільки включення) до кінцевої концентрації 8 М.

Визначення концентрації білка (C) проводили біуретовим методом. Для цього до 1,9 мл 0,1 н NaOH додавали 100 мкл зразка та 100 мкл фарби Бенедикта. Інкубували 15 хв та заміряли оптичну густину при довжині хвилі 330 нм (OD_{330}). Концентрацію білка розраховували за формулою $C = (OD_{330} - 0,0043)/0,087$ [мг/мл].

Електрофорез здійснювали методом Лемлі у 15%-му поліакріламідному гелі в денатурувальних умовах з додаванням 0,1% SDS з наступним забарвленням гелю в розчині Кумасі R-250 [5]. Обрахунок електрофореграм виконували за допомогою програми GelScan 5.1.

Імуноферментний аналіз (ІФА). При поставленні ІФА рекомбінантний білок сорбували в лунках планшета PolySorp (Nunc, Данія) в концентрації 1 мкг/мл у 100 мкл розчину, що містив 0,5М карбонатно-бікарбонатний буфер, pH 9,2, та інкубували протягом ночі при 37 °C. Як контроль використовували рекомбінантний аналог р24, синтезований у штамі BL21(DE3), який не піддавали рефолдингу. Після відмивання та блокування вільної поверхні вносили розведені 1:10 сироватки стандартної панелі позитивних (15) та негативних (14) сироваток крові ВРХ АТЗТ («НВК Діапроф-Мед», Україна). Інкубація тривала 1 год при 37 °C. Вміст лунок видаляли, промивали, вносили в них по 100 мкл моноклональних антитіл до IgG ВРХ, кон'югованих з пероксидазою хрому, та інкубували протягом 30 хв при 37 °C. Після відмивання нез'язаних компонентів у лунки додавали розчин проявника — субстрату пероксидази (пероксид водню) і хромогену (3,3'-, 5,5'-тетраметилбензидин) та інкубували при кімнатній температурі в темряві упродовж 30 хв. Кольорову реакцію зупиняли за допомогою стоп-реагента (0,5 М H_2SO_4). Оптичну густину в лунках визначали у двоххвильовому режимі (450 нм проти 620 нм). Критерієм якості рекомбінантного білка був показник співвідношення середніх значень оптичної густини позитивних та негативних сироваток OG_{cp}^+/OG_{cp}^- .

Хроматографічне очищення рекомбінантного білка. Металохелатафінну хроматографію проводили на хроматографічній

системі BioRad BioLogic LP. Як сорбент використовували IDA (iminodiacetic acid)-Toyopearl з іммобілізованими іонами Ni^{2+} . Білок наносили на колонку з розрахунку 5 мг білка на 1 мл сорбенту зі швидкістю потоку буфера 0,5 мл/хв. У процесі хроматографії застосовували: для розчинної фракції білків — буфер для лізису клітин; для очищення екстракту тілець включення — буфер, в якому розчиняли тількия включення; для сумарного денатурованого білка — буфер для лізису клітин з 8 М сечовиною. Елюцію білка, який зв'язався із сорбентом, проводили ступінчастим градієнтом імідазолу з використанням відповідних буферів. Вміст білка в одержаних фракціях контролювали електрофоретичним аналізом.

Рефолдинг денатурованого білка здійснювали методом розведення: препарат очищеного білка додавали до ренатураційного буфера у співвідношенні об'ємів 1:9 (склад буферів наведено в табл. 1). Розчин струшували на шейкері протягом 60 хв, після чого видаляли центрифугуванням (10 000g, 15 хв) агрегати нерозчиненого білка.

Результати та обговорення

Для трансформації штамів-реципієнтів *E. coli* використовували рекомбінантну плазмиду рЕТ24а, що містить вставку гена, яка кодує білок р24 BLV; транскрипція його контролюється промотором бактеріофага Т7. Ця генетична конструкція забезпечує суперсинтез рекомбінантних білків. Для експресії клонуваних генів у таких векторах застосовують кілька штамів-реципієнтів *E. coli*, які за своїм призначенням можна розділити на три групи: 1) для загального призначення — *E. coli* BL21(DE3); 2) для експресії рекомбінантних генів, що містять рідкісні кодони, — *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIL, *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RP та ін.; 3) для більш жорсткої регуляції експресії токсичних білків — *E. coli* BL21 AI, *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. З метою визначення оптимального штам-реципієнта нами було проведено трансформацію рекомбінантною плазмидою рЕТ24а-р24BLV клітин чотирьох штамів: *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIL, *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RP, *E. coli* BL21 AI, які представляють кожну із цих груп.

Як свідчать дані електрофоретичного аналізу (рис. 1), в усіх досліджуваних лізатах спостерігається індукований біосинтез поліпептиду очікуваної молекулярної маси (~25кДа). За результатами комп'ютерного

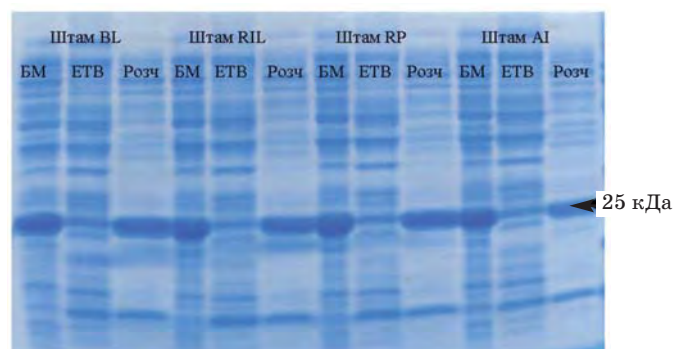


Рис. 1. Електрофореграма розподілу рекомбінантного білка р24 за фракціями для різних штамів-реципієнтів *E. coli*:

БМ — лізат біомаси;
 ЕТВ — екстракт тілець включення;
 Розч — розчинна фракція;
 BL — *E. coli* BL21(DE3);
 RIL — *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIL;
 RP — *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RP;
 AI — *E. coli* BL21(DE3) AI

обрахунку електрофореграм не було виявлено істотних відмінностей між клонами за рівнем біосинтезу цільового білка, який варіював від 26 до 31%.

Переважає частина рекомбінантного білка р24 синтезується в розчинній формі (90–93%). Для використаної в роботі рекомбінантної плазмиди рЕТ24а-р24BLV зміна штам-реципієнта мала значний вплив на антигенні властивості білка, які оцінювали за показником $\text{OG}_{\text{ep}}^{+}/\text{OG}_{\text{ep}}^{-}$ в ІФА. Як штам-реципієнт відібрали *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIL з найвищими показниками $\text{OG}_{\text{ep}}^{+}/\text{OG}_{\text{ep}}^{-}$ — 8,3. Штам-продуцент, названий *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIL-р24, було висіяно на рідкі живильні середовища LB, TB, M4 та 2YT (попередньо посівні дози було стандартизовано за оптичною густиною).

Найбільший вихід біомаси було одержано в разі культивування продуцента на середовищі TB. Це можна пояснити збагаченим складом середовища та наявністю в ньому буферної системи, що запобігає зниженню рН у процесі культивування і таким чином попереджає інгібування росту бактерій кислотними продуктами метаболізму. З біомаси, отриманої при культивуванні на кожному із середовищ, було одержано дві фракції — тількия включення та розчинні білки цитоплазми. Вихід білка в обох фракціях, відносний вміст його у тількиях включення та розчинній фракції, а також результати ІФА подано на рис. 2.

Як свідчать наведені дані, тип живильного середовища впливає як на кількісний

Таблиця 1. Склад буферів, використаних для рефолдингу рекомбінантного аналога білка р24

Номер буфера	MES, pH 6,5, мМ	Tris-HCL, pH 8,21, мМ	NaCl, мМ	KCl, мМ	MgCl ₂ , мМ	CaCl ₂ , мМ	Guanidin HCl, М	Triton X-100, %	DDT, мМ	PEG, %	GSH, мМ	GSSH, мМ	Сахароза, М	ЕДТА, мМ
1	55		10,56	0,44	2,2	2,2	0,75	0,5	1					
2	55		10,56	0,44			0,75	0,5	1	0,055				1,1
3	55		264	11			0,75		1				0,44	1,1
4	55		264	11	2,2	2,2	0,75		1	0,055				
5		55	10,56	0,44	2,2	2,2		0,5		0,055	1	0,1	0,44	
6		55	10,56	0,44				0,5	1					1,1
7		55	264	11						0,055	1	0,1		1,1
8		55	10,56	0,44	2,2	2,2	0,75				1	0,1	0,44	
9		55	264	11						0,055				1,1
10		55	10,56	0,44									0,44	1,1
11		55	10,56	0,44	2,2	2,2		0,5		0,055				
12	55		264	11	2,2	2,2	0,75			0,055	1	0,1	0,44	
13	55		10,56	0,44	2,2	2,2	0,55							
14		55	10,56	0,44			0,55		1	0,055			0,44	1,1
15	55		10,56	0,44			0,55			0,055			0,44	1,1
16		55	264	11			0,55							1,1
17		55	264	11			0,75		1					1,1
18	55		264	11	2,2	2,2	0,75		1	0,055	1	0,1		

Примітка. Сірим кольором виділено буфери, білок після рефолдингу в яких мав найвищі значення OG_{cp}^{+}/OG_{cp}^{-} за результатами ІФА.

вихід цільового продукту, так і на розподіл його між фракціями, а також і на його антигенні характеристики. Згідно з даними ІФА, найвищий показник OG_{cp}^{+}/OG_{cp}^{-} має білок, одержаний зі штаму *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIL-p24, вирощеного на середовищі *TB*.

Нуклеотидна послідовність гена-вставки, який кодує білок р24, містить кодони, що рідко трапляються в геномі *E. coli*, але є більш поширеними в геномах вищих видів, зокрема людини, та вірусів, що персистерують у цих видах. Штами *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIL та *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RP мають екстракопії генів тРНК, що відповідають рідкісним кодонам. Штам *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIL містить тРНК для більшої кількості рідкісних кодонів, присутніх у клонованій вставці ДНК, що, очевидно, й зумовлює вищу антигенну якість білка, синтезованого з рекомбінантної матриці в цьому штамі.

Для максимально ефективного відокремлення цільового поліпептиду від клітинних білків *E. coli* було оптимізовано методику

очищення рекомбінантного білка р24 шляхом підбору оптимальних концентрацій імідазолу для елюції з колонки. Із цією метою використовували проміжну елюцію сорбованого білка буферними розчинами, що містили 20, 40, 50 та 70 мМ імідазолу. Оптимальною було визнано схему очищення із нанесенням білкового екстракту на колонку в буфері з 40 мМ імідазолу та елюцією цільового білка буфером, що містив 100 мМ імідазолу. За цією схемою було одержано препарат рекомбінантного білка р24 зі ступенем чистоти 98%.

Для поліпшення антигенних характеристик очищеного рекомбінантного білка виконували процедуру рефолдингу з використанням ренатураційних буферних розчинів, рекомендованих для рефолдингу рекомбінантних білків виробниками спеціалізованих наборів для рефолдингу Protein Refolding Kits (Hampton Research, USA, www.Hamptonresearch.com) та Athenaes (USA, www.Athenaes.com) з певними модифікаціями (табл.1).

Після проведення попереднього скринінгу ренатураційних буферів різного складу за результатами ІФА найвищий показник

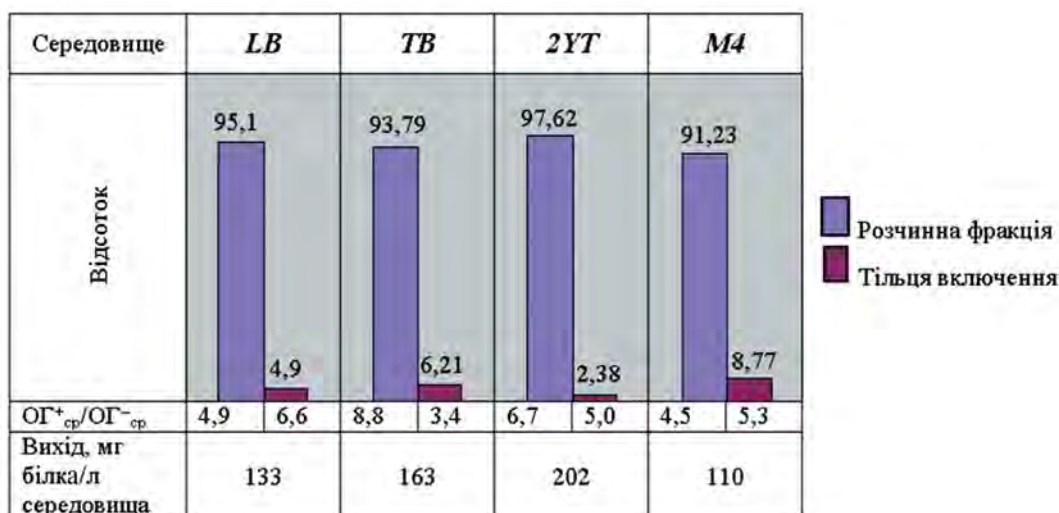


Рис. 2. Залежність рівня біосинтезу рекомбінантного аналога білка p24 у клітинах штаму *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIL від типу живильного середовища:

OD^+_{cp}/OD^-_{cp} — співвідношення середніх значень оптичної густини позитивних та негативних сироваток за ІФА

Таблиця 2. Результати ІФА після проведення рефолдингу рекомбінантного білка p24

Номер буфера	4		7		8		17		18		Ref	
Сироватки	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
OD_{cp}	0,585	0,037	0,544	0,035	0,655	0,039	0,67	0,048	0,570	0,036	0,398	0,033
$\frac{OD^+_{cp}}{OD^-_{cp}}$	15,8		15,5		16,7		14,0		16,0		12,0	

Примітка: «+» — позитивні сироватки; «-» — негативні сироватки;

OD_{cp} — середнє значення оптичної густини;

OD^+_{cp}/OD^-_{cp} — співвідношення середніх значень оптичної густини позитивних та негативних сироваток;

Ref — рекомбінантний білок p24, який використовується у тест-системі DIA-BLV-Ab.

OD^+_{cp}/OD^-_{cp} спостерігався у білка після рефолдингу в буфері №8 (табл. 2). Цей результат можна пояснити тим, що підібраний склад компонентів буфера для рефолдингу дозволяє більшому відсотку молекул очищеного білка перейти у відповідний конформаційний стан, коли антигенні детермінанти молекули стають доступнішими для зв'язування специфічних антитіл порівняно з референсним білком p24.

Таким чином, у результаті проведених досліджень нами розроблено ефективну технологію одержання рекомбінантного аналога білка p24 вірусу бичачої лейкемії з поліпшеними антигенними властивостями, викори-

стання якого може сприяти підвищенню специфічності та чутливості сучасних імуноферментних діагностичних тест-систем для виявлення збудника цього захворювання.

ЛІТЕРАТУРА

1. Kabeya H., Ohashi K., Onuma M. Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection // J. Vet. Sci. — 2001. — V. 63. — N. 7. — P. 703–708.
2. Stephenson J., Warnes A. Recombinant antigens in viral diagnostic // Methods in Molecular Medicine. Diagnostic Virology Protocols, Humana Press — 1998. — V. 12. — P. 315–330.
3. Gonzales E., Bonzo E., Echeverria M et al. Enzootic bovine leucosis: development of an indirect enzyme linked immunosorbent assay (I-ELISA) in seroepidemiological studies // Revista de Microbiologia. — 1999. — V. 30. — P. 37–42.
4. Манниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 476 с.
5. Laemli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — V. 227. — P. 680–685.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АНАЛОГА БЕЛКА Р24 ВИРУСА BLV

А. Н. Коновалова
Ю. А. Кобозев
Н. И. Грабченко
Л. А. Ганова

АТЗТ Научно-производственная компания
«Дианроф-Мед», Киев
E-mail: kon_anna@ukr.net

Разработана высокоэффективная технология получения рекомбинантного аналога белка р24 вируса бычьей лейкемии с подтвержденными методом иммуноферментного анализа (ИФА) антигенными свойствами. В процессе исследований выбран наилучший штамм-реципиент *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIL для интродукции рекомбинантной плазмиды и оптимизирован состав питательной среды. Разработана методика проведения металлохелатаффинной хроматографической очистки и рефолдинга рекомбинантного белка. В качестве критерия эффективности каждого этапа использовали ИФА, с помощью которого контролировали антигенные характеристики рекомбинантного белка. Установлено, что вид штамма-продуцента и состав питательной среды влияют на продуктивность и распределение рекомбинантного белка между цитоплазматической и нерастворимой фракциями в клетке. Разработанная технология дает возможность получать препараты белка со степенью чистоты 98% и улучшенными антигенными свойствами, что позволяет использовать его для увеличения специфичности и чувствительности иммуноферментных диагностических тест-систем для выявления возбудителя бычьей лейкемии.

Ключевые слова: вирус бычьей лейкемии, белок р24, *Escherichia coli* BL21(DE3), металлохелатаффинная хроматография, рефолдинг, иммуноферментный анализ.

SYNTHESIS OF RECOMBINANT ANALOGUE OF P24 PROTEIN OF BLV VIRUS

A. M. Konovalova
Y. O. Kobozhev
N. I. Grabchenko
L. O. Ganova

JST «Diaproph-Med», Kyiv
E-mail: kon_anna@ukr.net

Highly effective technology for production of recombinant analogue of p24 protein of bovine leukemia virus with proven antigenic properties using immunoenzyme was developed. During investigation the best strain *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIL for introduction of recombinant plasmid was chosen, the composition of growth media was optimized. The procedure of metal-helate-affinity chromatography and refolding of recombinant protein was developed. The results of immunoenzyme were used as criteria of quality of recombinant protein on each stage of the work. The influence of bacterial host strains and growth media composition on the yield and distribution of recombinant protein between soluble form in cytoplasm and insoluble inclusion bodies was shown. Using this technology it is possible to obtain recombinant protein with 98% purity and improved antigenic properties. This protein can be used to increase specificity and sensitivity of BLV-diagnostic test kits based on results of immunoenzyme.

Key words: bovine leukemia virus, protein p24, *Escherichia coli* BL21 (DE3), metal-helate affinity chromatography, refolding, enzyme-linked immunosorbent assay.