

ОТРИМАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ ФРАГМЕНТІВ СТРЕПТОКІНАЗИ

Л. Л. Карбовський^{1, 2}
В. В. Скалка²
О. Г. Мінченко³

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка
²Shijir International LLC., Улан-Батор, Монголія
³Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

E-mail: ominchenko@yahoo.com

Фрагменти гена стрептокінази (СК), що кодують протеїнові продукти СК1-50 та СК1-60, було ампліфіковано та клоновано у плазмідному векторі. Експресію рекомбінантних фрагментів стрептокінази, кодованих цими генетичними конструкціями, здійснено в клітинах *Escherichia coli* Tuner (DE3) під контролем T7- промотору. Для отримання чистих фрагментів стрептокінази було проведено двостадійний процес їх хроматографічного очищення з бактеріальних лізатів у денатуруючих умовах. За допомогою імуноблотингу з використанням анти-стрептокіназних антитіл підтверджено автентичність отриманих фрагментів стрептокінази.

Ключові слова: фрагменти стрептокінази, клонування, експресія, тільки включення, хроматографічне очищення.

На сьогодні стрептокіназа є одним з найпоширеніших протеїнів, препарати якого досить ефективно застосовують для тромболітичної терапії. Використання стрептокінази в клінічній практиці обумовлює необхідність глибокого вивчення складних механізмів взаємодії цього протеїну з плазміногеном та іншими компонентами системи гемостазу.

Стрептокіназа продукується деякими видами роду *Streptococcus* і здатна активувати систему фібринолізу, перетворюючи плазміноген на плазмін [1]. Встановлено, що стрептокіназа може зв'язуватися з плазміногеном і внаслідок конформаційних змін індукувати утворення активного центру в протеїназному домені плазміногена [2, 3]. Утворений активний центр каталізує перетворення плазміногена на плазмін шляхом розщеплення пептидного зв'язку Arg⁵⁶¹ — Val⁵⁶² [4, 5].

Молекула стрептокінази синтезується у вигляді одноланцюгового поліпептиду, що складається з 440 амінокислотних залишків і не містить дисульфідних зв'язків [6]. Під час дозрівання відбувається відщеплення сигнального пептиду і утворення зрілого протеїну, що містить 414 амінокислот та має молекулярну масу близько 47 кДа [7]. СК має три гомологічних домени: α (залишки 1–146), β (залишки 147–290), γ (залишки 290–414), фолдинг яких відбувається неза-

лежно [8]. Кожен домен зв'язується з плазміногеном, водночас жоден із них не здатен активувати плазміноген окремо [9, 10, 11].

Амінокислотні залишки 1–59 α -домени стрептокінази (СК^{1–59}) відіграють важливу роль в активації плазміногена. У процесі інкубування стрептокінази з плазміногеном пептидний зв'язок Lys⁵⁹ — Ser⁶⁰ швидко гідролізується, а утворений N-кінцевий пептид СК^{1–59} залишається асоційованим з комплексом стрептокіназа — плазміноген [12]. Встановлено, що під час часткового протеолізу стрептокінази за допомогою α -хімотрипсину можна отримати фрагмент стрептокінази СК^{1–63}, близький за структурою до фрагмента стрептокінази СК^{1–59}, однак він не виявляє активуючої дії щодо плазміногена *in vitro* [13, 14]. Стрептокіназа, що не містить залишків 1–59 (СК^{60–414}), формує стабільний комплекс із плазміногеном, який характеризується значно меншою здатністю перетворювати плазміноген на плазмін [15]. Разом з тим було встановлено, що інкубація фрагментів стрептокінази СК^{1–63} або СК^{1–59} із фрагментом СК^{60–414} призводить до відновлення активації плазміногена [12]. Послідовність амінокислот 1–59 також зумовлює здатність стрептокінази активувати плазміноген за відсутності фібрину, що й відрізняє стрептокіназу від тканинного активатора плазміногена. А низька активність фрагмен-

та стрептокінази СК⁶⁰⁻⁴¹⁴ значно підвищується у присутності фібрину [16].

Метою цієї роботи було створення експресійних генетичних конструкцій для отримання коротких N-кінцевих фрагментів стрептокінази в *Escherichia coli* та розроблення способів їх очищення.

Матеріали і методи

Створення генетичних конструкцій для експресії коротких N-кінцевих фрагментів стрептокінази в E. coli. Послідовність гена стрептокінази, що кодує N-кінцевий фрагмент (амінокислоти 1–60), підбирали відповідно до послідовності гена стрептокінази *Streptococcus equisimilis*, штаму H46A (GenBank accession number K02986). Фрагмент гена та олігонуклеотиди були хімічно синтезовані компанією Eurofins MWG Operon (Німеччина).

Для клонування фрагментів гена стрептокінази використовували плазмиди pET-Blue-1, pET-23b (Novagen, США) і штам *E. coli* NovaBlue (Novagen). Для дизайну олігонуклеотидних праймерів та інтерпретації одержаних результатів застосовували програму Vector NTI.

Для ампліфікації фрагмента гена стрептокінази СК¹⁻⁶⁰ завдовжки 180 п.н., який включав послідовності старт- та стоп-кодів, використовували пару праймерів: SK7 прямий праймер (5'-atgattgctggacgtgagtg-3') та SK7 зворотний праймер (5'-ttatgatttgacttaagccttg-3'). Продукт полімеразної ланцюгової реакції клонували у лінеаризованому рестрикційному ендонуклеазоу EcoRV векторі pET-Blue-1.

Фрагмент гена стрептокінази СК¹⁻⁵⁰ ампліфікували за допомогою праймерів: SK5 прямий праймер (5'-tatcatatgattgctggacgtgagtg-3') і SK5 зворотний праймер (5'-acctcgagttatcctccatgagcaggtcg-3'), які містили сайти рестрикції ендонуклеаз *NdeI* і *XhoI* (підкреслені). Вектор pET-23b та продукт полімеразної ланцюгової реакції гідролізували зазначеними вище рестрикційними ендонуклеазами, очищали і зшивали, використовуючи T4 -ДНК-лігазу (Sigma, США).

Рекомбінантними плазмідами трансформували *E. coli* NovaBlue методом електропорації на приладі Multiporator (Eppendorf, Німеччина). Скринінг отриманих клонів проводили методом ПЛР з використанням праймерів T7 Promoter, T7 Terminator, pETBlueUP, pETBlueDOWN (Novagen). Додатковий аналіз здійснювали за допомогою рестрикційного картування.

Експресія рекомбінантних протеїнів. Для отримання фрагментів стрептокінази використовували штам *E. coli* Tuner (DE3), який є похідним від штаму BL21 (DE3) і створений шляхом делеції гена мембранного переносника лактози (*lacY*), що дозволяє знизити не індуквану експресію цільових протеїнів до мінімального рівня, а також точніше контролювати експресію рекомбінантних протеїнів за допомогою зміни концентрації індуктора IPTG. Клітини *E. coli* Tuner (DE3) (Novagen, США) трансформували плазмідними конструкціями pET-Blue-1-СК¹⁻⁶⁰ та pET-23b-СК¹⁻⁵⁰.

Одиночну колонію інокулювали в 50 мл середовища LB (1% -й бактотриптон, 0,5% -й дріжджовий екстракт, 1% -й NaCl) з додаванням 50 мкг/мл карбеніциліну та 34 мкг/мл хлорамфеніколу і нарощували упродовж ночі. Попередньо нарощену культуру інокулювали в свіже середовище 2YT (1,7% -й бактотриптон, 1% -й дріжджовий екстракт, 0,5% -й NaCl) та культивували при 37 °C, інтенсивно струшуючи до досягнення оптичної густини 0,6 за довжини хвилі 600 нм. Індукування експресії здійснювали, вносячи в середовище ізопропіл-β-D-тіогалактопіранозид (IPTG) до кінцевої концентрації 1 mM. Після трьох годин культивування клітини збирали центрифугуванням при 5 000 g протягом 10 хв і осад клітин заморожували при –86 °C.

Тест на стабільність плазмідної трансформації. Бактеріальну культуру нарощували до OD₆₀₀ = 0,6 та розводили в культуральному середовищі. По 100 мкл розведення 10⁻⁶ висівали на чашку з LB-агаром з додаванням 50 мкг/мл карбеніциліну та на чашку без антибіотика. Також по 100 мкл розведеної культури висівали на чашку з IPTG (1 mM) і на чашку з IPTG та карбеніциліном. Інкубували в термостаті при 37 °C. Колонії підраховували наступного дня.

Виділення тілець включення. Осад клітин *E. coli* Tuner (DE3) розморожували в лізуючому буферному розчині (0,1 M Tris-HCl і 10 mM EDTA, pH 8,0), додаючи інгібітор PMSF до концентрації 1 mM. Для дезінтеграції клітин і руйнування хромосомної ДНК суспензію бактерій обробляли ультразвуком. Нерозчинні протеїни відділяли центрифугуванням (5 000 g, 10 хв). Тільця включення ресуспендували на ультразвуковому дезінтеграторі в лізуючому буферному розчині з 0,5% Triton X-100 та осаджували центрифугуванням. Процедура відмивання повторювали декілька разів. Частково відмиті тільця включення використовували

для хроматографічного очищення фрагментів стрептокінази або заморожували і зберігали при -86°C .

Хроматографічне очищення фрагментів стрептокінази. Хроматографію проводили з використанням системи для рідинної хроматографії АКТА Purifier (Amersham Biosciences, Швеція).

На першому етапі очищення фрагментів стрептокінази СК¹⁻⁶⁰ та СК¹⁻⁵⁰ застосовували катіонообмінну колонку HiPrep 16/10 CM FF (Amersham Biosciences) об'ємом 20 мл. Тільця включення розчиняли в буфері для нанесення (20 мМ цитрат натрію, рН 3,0, та 8 М сечовина) і наносили на врівноважену буфером колонку. Для елюції використовували лінійний градієнт NaCl (0–1 М) у тому самому буфері. Швидкість потоку становила 5 мл/хв.

Для наступного очищення фрагментів стрептокінази застосовували хроматографію з оберненими фазами, використовуючи колонки Resource RPC (Amersham Biosciences) об'ємом 3 мл. Колонки врівноважували буфером для нанесення (0,1% трифтороцтової кислоти з 5% ацетонітрилу). Фракції, що містили фрагмент стрептокінази, змішували з двократним буфером для нанесення (0,2% трифтороцтової кислоти з 10% ацетонітрилу) в рівних об'ємах. Елюцію протеїнів здійснювали лінійним градієнтом ацетонітрилу (5–60%) у буфері для нанесення. Швидкість потоку — 1 мл/хв.

Протеїнові фракції аналізували за допомогою електрофорезу методом Laemmli [12] в 15%-му поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію. Кількісний вміст протеїнів в окремих фракціях визначали методом денситометрії електрофореграм з наступним їх аналізом у програмі Total Lab (Amersham Biosciences). Для визначення концентрації фрагмента стрептокінази в очищених препаратах послуговувались теоретично розрахованим коефіцієнтом поглинання за довжини хвилі 280 нм.

Імуноблотинг. Після електрофоретичного розділення в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію протеїни з гелю переносили на нітроцелюлозну мембрану Hybond-C. Мембрану інкубували 1 год при 37°C у фосфатно-сольовому буфері, рН 7,4, який містив 5% знежиреного молока. Після цього мембрану промивали і вміщували в розчин кролячих антистрептокіназних антитіл та інкубували протягом 1 год при 37°C . Після промивання вносили розчин антитіл проти імуноглобулінів кроля, кон'югованих з пероксидазою хрому, й інку-

бували за тих самих умов. Для візуалізації протеїнових смужок мембрану переносили в розчин, що містив субстрат 3,3-діамінобензидин (Sigma, США).

Результати та обговорення

Дослідження мультифункціональних протеїнових молекул часто здійснюють шляхом отримання окремих їхніх частин та вивчення функціональних особливостей цих фрагментів. Існують різні підходи, що дозволяють одержати різноманітні протеїнові фрагменти: хімічний та ензиматичний гідроліз, а також технологія рекомбінантних ДНК. Хімічний гідроліз здійснюється в денатуруючих умовах і характеризується малою специфічністю, що значною мірою обмежує його використання в біохімічних дослідженнях. Ензиматичний гідроліз має високу специфічність дії, яка залежить від використаного для гідролізу ензиму та гідролізованого протеїну. Під час ензиматичного гідролізу першими гідролізуються легкодоступні пептидні зв'язки, які часто бувають між функціонально відокремленими ділянками молекули. У міру розщеплення з'являються нові доступні ділянки, раніше закриті для гідролізу. Таким чином, змінюючи ензими та варіюючи умовами гідролізу (час реакції, кількість ензиму та субстрату), можна одержати велику кількість фрагментів, що в сумі повністю репрезентують протеїнову молекулу. Останнім часом дедалі частіше застосовують технологію рекомбінантних ДНК, яка відкриває можливості отримання будь-якої частини молекули протеїну потрібної довжини, незалежно від сайтів протеолізу, розміщених у поліпептидному ланцюзі. Крім того, сайт-спрямований мутагенез уможливорює заміну або ж видалення окремих амінокислот чи певної амінокислотної послідовності.

Існуючі технології отримання фрагментів стрептокінази базуються на частковому її протеолізі за допомогою різних гідролітичних ензимів: трипсину [18], термолізіну [19], плазміну [11], комплексу стрептокіназа — плазмін(оген) [10], хімотрипсину [13, 14]. Зокрема, використовуючи α -хімотрипсин авторам вдалось отримати фрагменти стрептокінази з молекулярною масою 2 кДа (СК³⁸¹⁻³⁹⁷), 7 кДа (СК¹⁻⁶³), 11 кДа (СК²⁸⁸⁻³⁸⁰), 16 кДа (СК¹⁴⁷⁻²⁸⁷), 17 кДа (СК¹⁴⁷⁻¹⁹²), 26 кДа (СК⁶⁴⁻²⁹²), 27 кДа (СК¹⁴⁷⁻³⁸⁰), 36 кДа (СК⁶⁴⁻³⁸⁰) та дослідити їх вплив на перетворення плазміногена на плазмін.

Для експресії рекомбінантних фрагментів стрептокінази СК¹⁻⁵⁰ та СК¹⁻⁶⁰ нами було отримано плазмідні конструкції рЕТ-23b-СК¹⁻⁵⁰ і рЕТBlue-1-СК¹⁻⁶⁰. Ці конструкції аналізували на присутність вставки методом полімеразної ланцюгової реакції. Клони, в яких підтвердилась наявність вставки, додатково перевіряли рестрикційним гідролізом за допомогою ендонуклеаз *EcoRI* та *HincII* (рЕТBlue-1-СК¹⁻⁶⁰), а також *NdeI* та *HincII* (рЕТ-23b-СК¹⁻⁵⁰). Для встановлення нуклеотидної послідовності та виявлення можливих мутацій здійснювали секвенування обох ланцюгів ДНК. Конструкції, що не містили помилок, відбирали для подальшої роботи.

У зв'язку з невеликими розмірами N-кінцевих фрагментів стрептокінази та необхідністю подальшого їх використання для дослідження впливу на систему гемостазу було вирішено експресувати ці пептиди без додаткових амінокислотних залишків як з N-, так і С-кінця молекули у клітинах *E. coli* Tuner (DE3).

Електрофоретичний аналіз бактеріальних лізатів після індукції показав наявність додаткових протеїнових смуг з приблизною молекулярною масою 5 та 7 кДа, що збігається з теоретично розрахованою масою СК¹⁻⁵⁰ та СК¹⁻⁶⁰ відповідно. Накопичення цільових протеїнів відбувалося переважно у вигляді нерозчинних тілець включення, що часто спостерігається під час експресії чужорідних протеїнів у клітинах *E. coli*. Отримання біологічно активного протеїну з таких тілець включення потребує денатурації поліпептиду і подальшої ренатурації очищеного протеїну. Зважаючи на малі розміри фрагментів стрептокінази, відсутність складних структурних елементів та дисульфідних зв'язків у молекулі, цілком прийнятною є їх експресія в нерозчинній формі.

Першим етапом хроматографічного очищення фрагментів стрептокінази було обрано метод іонообмінної хроматографії на слабкому катіонообміннику CM — Sepharose FF. Вибір цього методу зумовлений тим, що на катіонообміннику не відбувається сорбція негативно заряджених нуклеїнових кислот, вміст яких є досить високим у лізатах бактеріальних культур. Окрім того, за кислих значень рН та низької іонної сили відбувається максимально ефективно видалення бактеріальних ендотоксинів [15].

Обидва параметри (вміст нуклеїнових кислот і ендотоксинів) досить жорстко регламентуються нормами Європейської фармакопеї для рекомбінантних протеїнових препаратів. Оскільки теоретично розрахована ізоелектрична точка фрагмента стрептокінази СК¹⁻⁵⁰ становить 4,58, а СК¹⁻⁶⁰ — 5,05, то для розчинення тілець включення й нанесення на колонку було обрано 20 мМ натрійцитратний буфер, що містив 8 М сечовини і мав рН 3,0. За таких умов обидва фрагменти були позитивно заряджені і зв'язувалися із сорбентом. Елюцію матеріалу, що зв'язався із сорбентом, здійснювали в тому самому буфері лінійним градієнтом NaCl (0–1 М).

Тільця включення, що містили фрагменти стрептокінази СК¹⁻⁵⁰ та СК¹⁻⁶⁰, наносили на колонку HiPrep 16/10 CM FF (рис. 1 і 2) й отримані хроматографічні фракції аналізували за допомогою електрофорезу. Цікавим виявився той факт, що в таких умовах відбувається повне зв'язування протеїнового матеріалу, а елюція бактеріальних протеїнів починається лише при 0,4 М NaCl. Таким чином, навіть після однієї стадії хроматографії нам вдалося досягнути високого ступеня чистоти цільових протеїнів.

Наступним етапом хроматографічного очищення фрагментів стрептокінази було обрано метод зворотно-фазової хроматографії. Такий вибір зумовлений тим, що сорбція протеїнів у даному разі може проводитися за високої концентрації солі, а відтак потреби у зміні буфера перед нанесенням зразка нема.

Фракції, збагачені фрагментами стрептокінази СК¹⁻⁵⁰ та СК¹⁻⁶⁰, наносили на колонку Resource RPC (рис. 3). Зв'язаний матеріал елюювали лінійним градієнтом ацетонітрилу (5–60%), що дозволило отримати протеїни з високим ступенем чистоти (рис. 4).

Автентичність одержаних рекомбінантних протеїнів було підтверджено за допомогою імуноблотингу з використанням анти-стрептокіназних антитіл (рис. 4, В).

Таким чином, нами було отримано рекомбінантні фрагменти стрептокінази, чистота яких після двох стадій хроматографічного очищення становила не менше 99%, що дає можливість використовувати їх для подальших наукових досліджень.

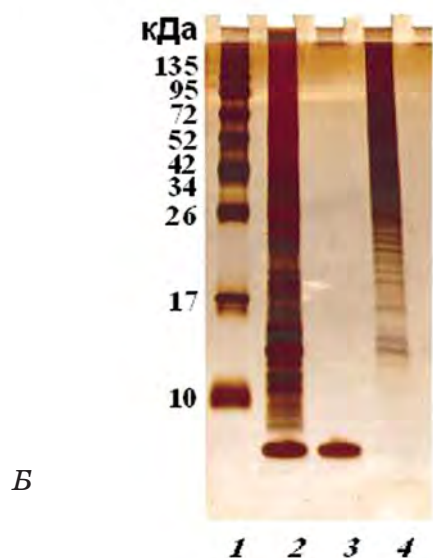
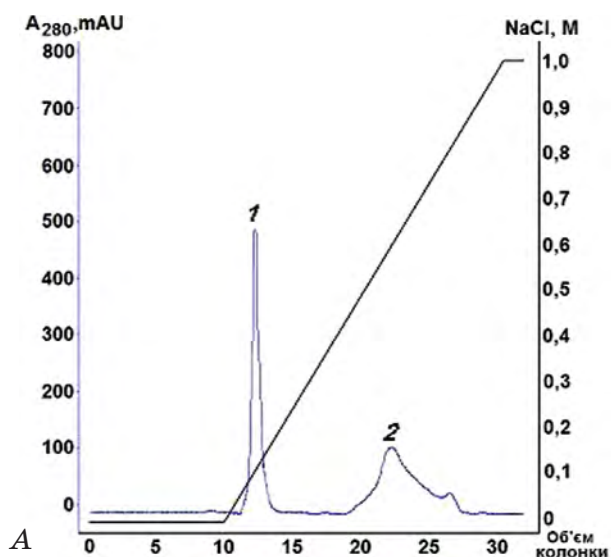


Рис. 1. Очищення фрагмента стрептокінази СК¹⁻⁵⁰ із бактеріальних лізатів на колонці HiPrep 16/10 CM FF та електрофорезом отриманих фракцій:

А — фракція, що містить СК¹⁻⁵⁰ (1); протеїнові домішки (2);

Б — протеїни-маркери молекулярної маси (1); відмиті тільця включення, що містять СК¹⁻⁵⁰ (2); хроматографічний пік №1, що містить очищений протеїн СК¹⁻⁵⁰ (3), хроматографічний пік №2 (4)

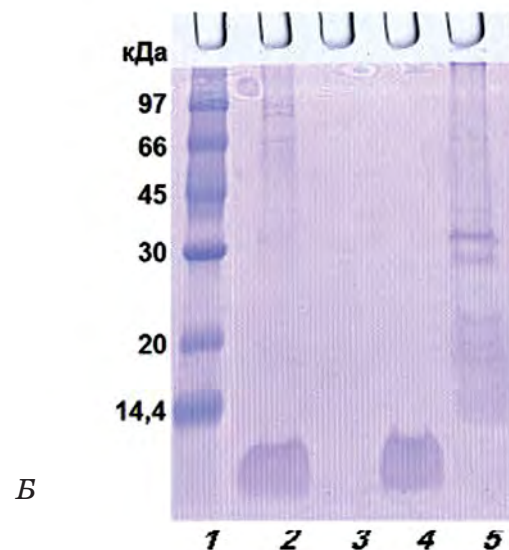
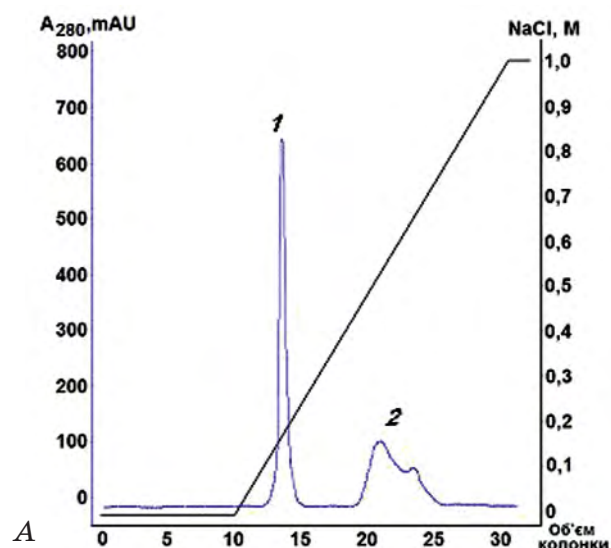


Рис. 2. Очищення фрагмента стрептокінази СК¹⁻⁶⁰ із бактеріальних лізатів на колонці HiPrep 16/10 CM FF та електрофорезом отриманих фракцій:

А — фракція, що містить СК¹⁻⁶⁰ (1); протеїнові домішки (2);

Б — протеїни-маркери молекулярної маси (1); тільця включення, що містять СК¹⁻⁶⁰ (2); фракція протеїнів, що не зв'язались із сорбентом (3); хроматографічний пік №1, що містить СК¹⁻⁶⁰ (4); хроматографічний пік №2 (5)

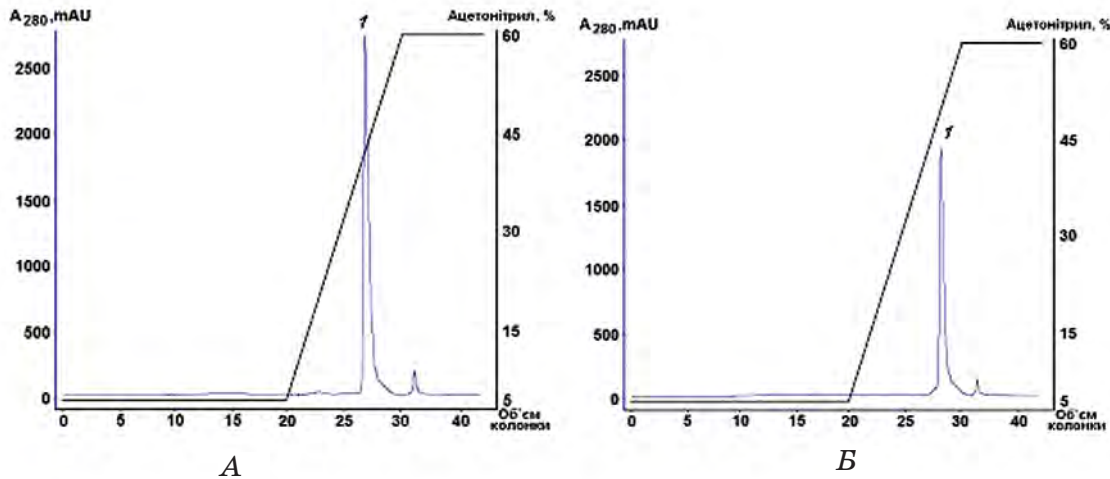


Рис. 3. Очищення фрагментів стрептокінази (фракції №1), отриманих під час розділення на колонці HiPrep 16/10 CM FF, що містить СК¹⁻⁵⁰ (А) та СК¹⁻⁶⁰ (Б), на Resource RPC

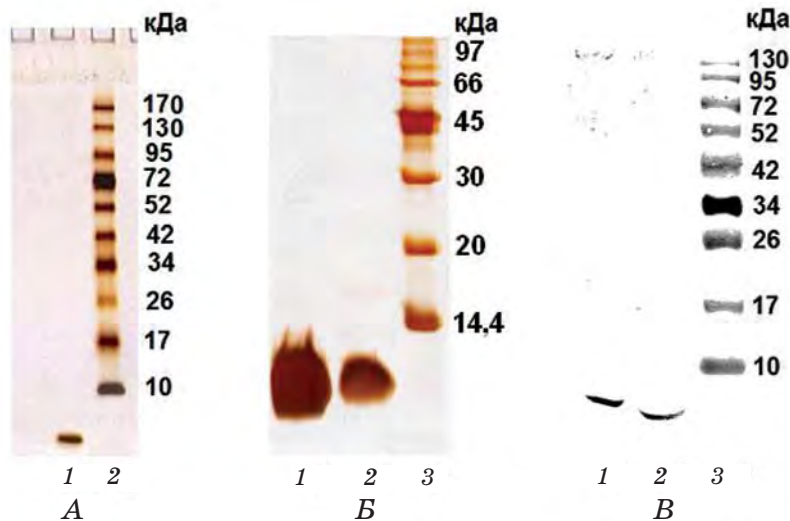


Рис. 4. Характеристика отриманих фрагментів стрептокінази:

А — електрофореграма хроматографічно очищеного СК¹⁻⁵⁰ (1) та маркери молекулярної маси (2);
 Б — електрофореграма хроматографічно очищеного СК¹⁻⁶⁰ (1, 2) та маркери молекулярної маси (3);
 В — блотограма СК¹⁻⁵⁰ (1), СК¹⁻⁶⁰ (2) та маркери молекулярної маси (3)

ЛІТЕРАТУРА

1. Christensen L. Streptococcal fibrinolysis: A proteolytic reaction due to a serum enzyme activated by streptococcal fibrinolysin // *J. Gen. Physiol.* — 1945. — V. 28. — P. 363–383.
2. Fuentes M., Valero E., Garcia-Moreno M. et al. Kinetic analysis of the mechanism of plasminogen activation by streptokinase // *J. Math. Chem.* — 2006. — V. 42, N. 4. — P. 753–774.
3. Yadav S., Datt M., Singh B., Sahni G. Role of the 88–97 loop in plasminogen activation by streptokinase probed through site-specific mutagenesis // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2008. — V. 1784. — P. 1310–1318.
4. Boxrud P., Bock P. Coupling of conformational and proteolytic activation in the kinetic mechanism of plasminogen activation by streptokinase // *J. Biol. Chem.* — 2004. — V. 279. — P. 36642–36649.
5. Tharp A., Laha M., Panizzi P. et al. Plasminogen substrate recognition by the streptokinase-plasminogen catalytic complex is facilitated by Arg253, Lys256, and Lys257 in the streptokinase beta-domain and kringle 5 of the substrate // *Ibid.* — 2009. — V. 284. — P. 19511–19521.
6. Lizano S., Johnston K. Structural diversity of streptokinase and activation of human plasminogen // *Infect. Immun.* — 2005. — V. 73. — P. 4451–4453.

7. Reddy K. Streptokinase — Biochemistry and clinical application // *Enzyme*. — 1988. — V. 40. — P. 79–89.
8. Wang X., Lin X., Loy J. *et al.* Crystal structure of the catalytic domain of human plasmin complexed with streptokinase // *Science*. — 1998. — V. 281. — P. 1662–1665.
9. Conejero-Lara F., Parrado J., Azuaga A. *et al.* Analysis of the interactions between streptokinase domains and human plasminogen // *Protein Sci.* — 1998. — V. 7. — P. 2190–2199.
10. Rodriguez P., Fuentes P., Barro M. *et al.* Structural domains of streptokinase involved in the interaction with plasminogen // *Eur. J. Biochem.* — 1995. — V. 229. — P. 83–90.
11. Shi C., Chang B., Chen S. *et al.* Function of streptokinase fragments in plasminogen activation // *Biochem. J.* — 1994. — V. 304. — P. 235–241.
12. Nihalani D., Kumar R., Rajagopal K., Sahni G. Role of the amino-terminal region of streptokinase in the generation of a fully functional plasminogen activator complex probed with synthetic peptides // *Protein Sci.* — 1998. — V. 7. — P. 637–648.
13. Parrado J., Conejero-Lara F., Smith R. *et al.* The domain organization of streptokinase: Nuclear magnetic resonance, circular dichroism, and functional characterization of proteolytic fragments // *Ibid.* — 1996. — V. 5. — P. 693–704.
14. Гаврилюк С.П., Савчук О.М., Остапченко Л.І. Вплив нетоксичного 7 кДа фрагменту стрептокінази на параметри системи гемостазу // *Совр. пробл. токсикол.* — 2008. — № 4. — С. 52–55.
15. Fay W. P., Bokka L. Functional analysis of the amino and carboxyl termini of streptokinase // *Thromb. Haemostasis*. — 1998. — V. 79. — P. 985–991.
16. Reed G., Hounig A., Liu L. *et al.* A catalytic switch and the conversion of streptokinase to a fibrin-targeted plasminogen activator // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1999. — V. 96. — P. 8879–8883.
17. Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. — 1970. — V. 227. — P. 680–685.
18. Nakashima A., Okada T., Sugie R. Fibrin-dependent activation of plasminogen by a proteolytic digest of streptokinase // *Fibrinolysis*. — 1990. — V. 227. — P. 279–284.
19. Misselwitz R., Kraft R., Kostka S. *et al.* Limited proteolysis of streptokinase and properties of some fragments // *Int. J. Biol. Macromol.* — 1992. — V. 14. — P. 107–116.
20. Petsch D., Anspach F. Endotoxin removal from protein solutions // *J. Biotechnol.* — 2000. — V. 76. — P. 97–119.
21. Magalhaes P., Lopes A., Mazzola P. *et al.* Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review // *J. Pharm. Pharmacol. Sci.* — 2007. — V. 10. — P. 388–404.

**ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ФРАГМЕНТОВ
СТРЕПТОКИНАЗЫ**

*Л. Л. Карбовский^{1,2}
В. В. Скалка²
А. Г. Минченко³*

¹Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко

²Shijir International LLC.,
Улан-Батор, Монголия

³Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

E-mail: ominchenko@yahoo.com

Фрагменты гена стрептокиназы, кодирующие протеиновые продукты SK¹⁻⁵⁰ и SK¹⁻⁶⁰, были амплифицированы и клонированы в плазмидном векторе. Экспрессия рекомбинантных протеинов проведена в клетках *Escherichia coli* Tuner (DE3) под контролем T7-промотора. Разработан двухэтапный процесс хроматографической очистки целевых протеинов с бактериальных лизатов в денатурирующих условиях. Аутентичность полученных протеинов подтверждена с помощью иммуноблотинга с использованием антистрептокиназных антител.

Ключевые слова: фрагменты стрептокиназы, клонирование, экспрессия, тельца включения, хроматографическая очистка.

**OBTAINING OF RECOMBINANT LOW
MOLECULAR WEIGHT STREPTOKINASE
FRAGMENTS**

*L. L. Karbovskyi^{1,2}
V. V. Skalka²
O. G. Minchenko³*

¹Taras Shevchenko Kyiv National University

²Shijir International LLC,
Mongolia, Ulaanbaatar

³Palladin Institute of Biochemistry of
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: ominchenko@yahoo.com

Streptokinase gene fragments, which encodes peptide products SK¹⁻⁵⁰ and SK¹⁻⁶⁰, were amplified and cloned into plasmid vector. Expression of recombinant protein fragments was performed in *Escherichia coli* strain Tuner (DE3) cells under T7- promoter control. Two step chromatography purification processes of desired proteins from bacterial lysates under denaturing conditions were developed. Authenticity of obtained proteins has been confirmed using immune blotting with antistreptokinase antibody.

Key words: streptokinase fragments, cloning, expression, inclusion bodies, chromatographic purification.