

трансформировали в клетки *E.coli* XL-1 blue, при отборе трансформантов по признаку устойчивости к канамицину. Из клеток отобранных клонов выделяли ДНК и проводили ПЦР для проверки наличия вставки. По результатам электрофореза (рис. 1) было показано, что вставка обнаружена в составе сконструированных рекомбинантных плазмид.

Следующим этапом эксперимента стала проверка наличия и правильной ориентации вставки в плазмиде. Рестрикционный анализ по сайтам *NheI* и *StuI* показал, что вставка находится в векторе в правильном положении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с поставленной задачей, была рассмотрена организация цирковируса свиней второго типа и сконструировано два экспериментальных вектора, несущих ген капсидного белка ЦВС-2 с сигналом ядерной локализации и без него.

Литература

1. Интернет-адрес: <http://aasv.org/shap/issues/v5n5/v5n5p201.html>
2. Интернет-адрес: <http://msd-animal-health.ru/publications/2010-06-02.aspx>
3. Интернет-адрес: <http://meduniver.com/Medical/Microbiology/999.html>
4. Tang DC. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response./ DC Tang , M. DeVit., SA Johnston.// Nature. – 1992. – 356(6365):152-4.
5. Интернет-адрес: <http://biomolecula.ru/content/1630>
6. *Зверев В.В.* Вакцинопрофилактика: прошлое, настоящее, будущее // Вестник биотехнологии. – 2006. – 2, № 2.– с. 58–62.
7. *Кудин К. В.* Клонирование гена белка капсида белорусского штамма цирковируса свиней 2 типа / К. В. Кудин, В. А. Прокулевич // Вестник БГУ. – 2011. – Сер. 2. – № 2.– С. 37.

РЕФОЛДИНГ РЕКОМБИНАНТНОГО ЭКТОДОМЕНА ЭФРИНОВОГО РЕЦЕПТОРА ТИПА A5

А. В. Жидецкий

Эфриновые рецепторы и их лиганды эфрины являются представителями семейства тирозиновых киназ. Гены рецепторов данного класса активно экспрессируется во время эмбрионального развития организма во многих тканях, участвуя в регуляции направления роста аксонов, образования нейрональных связей при формировании топографических карт зрительной и двигательной систем, морфогенезе тканей, ангиогенезе и межклеточных взаимодействий [1, 2, 3]. Помимо функционирования в здоровых клетках и тканях, эфриновые рецепторы и эфрины играют важную роль в процессе канцерогенеза, участвуя в неоангиогенезе, мета-

стазировании и инвазии опухолевых клеток [4, 5]. В связи с этим данная группа рецепторов и их лигандов представляет огромный интерес в качестве объектов целевой терапии рака и патогенезе тканей [6]. Одним из таких направлений является поиск различных молекул антагонистов, которые подавляют работу своих рецепторов-мишеней [7]. Однако для реализации такого подхода требуется значительное количество целевого белка, которое невозможно или очень трудно получить с помощью обычных методов выделения из клеток и тканей. Данную проблему помогает решить метод экспрессии рекомбинантных белков штаммами-продуцентами, которые накапливают химерный белок в больших количествах в виде телец включения. Последние представляют собой в основном неструктурированные агрегаты целевого продукта с включением белков и нуклеиновых кислот клетки-продуцента [8]. Причём с помощью генно-инженерных подходов можно сконструировать целевой продукт с рядом преимуществ, в частности можно встроить так называемые Tag-фрагменты, имеющие высокое сродство к металл-хелатирующим сорбентам, что в дальнейшем облегчает процессы очистки целевого продукта от примесных соединений и дает возможность его рефолдинга непосредственно на хроматографической колонке [9, 10].

Целью данной работы явилось осуществление рефолдинга рекомбинантного ECD EphA5 методом колоночной хроматографии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

- *Система экспрессии рекомбинантного белка.* Для получения препаративных количеств рекомбинантного эктодомена рецептора EphA5 использовалась система экспрессии на основе штамма *E.coli* Origami B (DE3). Штамм *E.coli*, содержащий конструкцию на основе плазмиды pEX32 для экспрессии рекомбинантного эфринового рецептора типа A5, включающего кроме белковой части целевого продукта тиоредоксиновый фрагмент, (His)₆-Tag и сайт разрезания для тромбина, был разработан в биотехнологическом центре университета города Турку (Финляндия) и любезно предоставлен профессором Ю.-П. Химаненом.

- *Отмывка телец включения.* Отмывка ТВ заключалась в трехстадийном применении отмывочных растворов. На первом этапе использовался раствор 0,2 моль/л NaCl, далее 50 ммоль/л Tris буфер с pH 10,0, содержащий 0,2 моль/л NaCl, 1 ммоль/л EDTA, 1 % изопропанол и 3,5 моль/л мочевины, после чего тельца отмывались еще раз раствором 0,2 моль/л NaCl.

- *Солюбилизация белков из телец включения.* ТВ растворяли в 50 ммоль/л Tris-HCl буфере с pH 8,0, содержащем 8 моль/л мочевины, 1 ммоль/л EDTA, 10 ммоль/л β-меркаптоэтанол и 0,5 моль/л NaCl
- *Ионообменная хроматография.* Процесс концентрирования целевого продукта, удаление EDTA, β-меркаптоэтанола, а также нуклеиновых кислот (НК) проводили с использованием анионообменника Toyopearl DEAE 650-M.
- *Рефолдинг на колонке с применением металл-хелатная хроматография на Ni-сефарозе.* Связывание (His)₆-Tag, присутствующего в структуре рекомбинантного белка, осуществлялось на колонке с Ni-сефарозой. Колонку предварительно уравнивали буфером следующего состава: 50 ммоль/л Tris-HCl, pH 8,0, 0,3 моль/л NaCl, 6 моль/л мочевины. После связывания ECD EphA5 с (His)₆-Tag с сорбентом колонка промывалась стартовым буферным раствором для удаления не связавшихся фракций примесных белков и оставшихся НК. Процесс рефолдинга происходил на колонке и осуществлялся с помощью линейного градиента от 0 до 100 % рефолдинг буфера (20 ммоль/л Tris-HCl, pH 8, 0,4 моль/л сахара, 1 ммоль/л цистеин и 0,1 ммоль/л цистин) и соответственно понижением стартового буфера. Далее колонка промывалась буфером (20 ммоль/л Tris-HCl, pH 8, 10 ммоль/л имидазол) для удаления рефолдинг буфера. Элюцию целевого продукта осуществляли буферным раствором, содержащим 20 ммоль/л Tris-HCl, pH 8, 0,5 моль/л имидазол.
- *SDS-электрофорез в полиакриламидном геле.* Чистоту белковых фракций оценивали методом SDS-электрофореза в 12,5 % полиакриламидном геле по стандартной методике [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Применение вышеописанной методики отмывки ТВ позволило избавиться вплоть до 60–65 % примесного материала от исходной массы телец включения с незначительной потерей (до 5 %) целевого продукта. Отмытые тельца включения вносили в солюбилизирующий буфер, оптимальный состав которого нами был определен ранее [12], обрабатывали ультразвуком для дезинтеграции агрегатов ТВ и оставляли на ночь при постоянном перемешивании на магнитной мешалке для полного растворения ТВ. После удаления не растворившейся материи с помощью центрифугирования, полученный солюбилизиат наносили на колонку с анионообменной смолой Toyopearl DEAE 650-M, предварительно уравниваемую буфером следующего состава: 20 ммоль/л Tris-HCl, pH 8, 6 моль/л мочевины. После промывки колонки стартовым буфером от не

связавшихся фракций белка, целевой продукт элюировали тем же буферным раствором, но содержащим 0,3 моль/л NaCl. Элюцию НК проводили буфером с более высокой ионной силой, а именно 50 ммоль/л Tris-HCl, pH 8, 6 моль/л мочевины, 1 моль/л NaCl. На основании результатов спектрального анализа образцов с этапов отмывки, солюбилизации и ионообменной хроматографии (ИОХ), было отмечено, что происходит постепенный сдвиг максимума поглощения солюбилизата из области 260 нм (поглощение НК) в область поглощения белков при 280 нм, что свидетельствует об успешной очистке целевого продукта от НК.

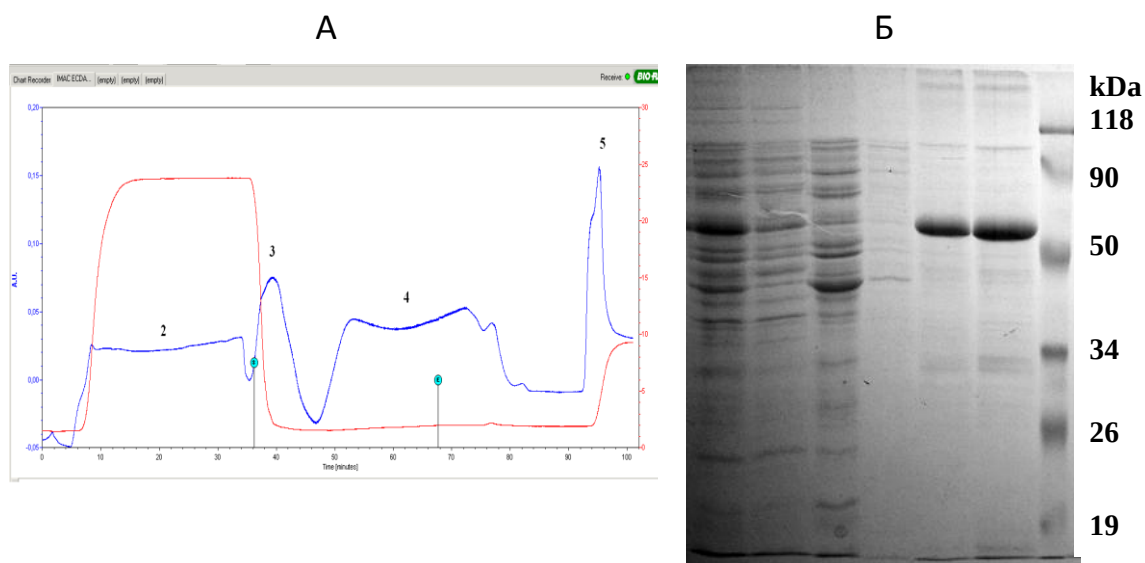


Рис. 1. А.- Металл-хелатная хроматография экстракта телец включения на Ni-сефарозе; Б.- Контроль постадийной очистки и рефолдинга ECD EphA5 методом SDS-электрофореза в ПААГ

1-Образец после элюции с Toyopearl DEAE 650-M; 2-Фракция не связавшаяся с Ni-сефарозой; 3-Фракция, элюированная с Ni-сефарозы во время рефолдинга; 4-фракция, элюированная во время промывки колонки буфером А (20 ммоль/л Tris-HCl, pH 8, 10 ммоль/л имидазол); 4-фракция после элюции с Ni-сефарозы буфером Б (0,5 моль/л Tris-HCl, pH 8, 10 ммоль/л имидазол); 5-фракция после элюции с Ni-сефарозы буфером Б (0,5 моль/л Tris-HCl, pH 8, 10 ммоль/л имидазол) – не редуцирующие условия; 6-маркеры молекулярных масс.

После проведения ИОХ, элюированную фракцию, содержащую целевой продукт наносили на колонку с Ni-сефарозой для проведения одностадийного процесса очистки и рефолдинга (рисунок 1). Наличие в структуре полипептидной цепи фрагмента (His)₆-Tag и его высокому сродству к ионам Ni²⁺ позволяет значительно очистить целевой белок от примесей, имеющих намного меньшее сродство к ионам данного тип. Благодаря адсорбции молекул целевого белка на матрице сорбента и пространственному удалению их друг от друга, удастся: а) избежать неспецифического взаимодействия молекул; б) предотвратить агрега-

цию целевого продукта; в) повысить выход целевого продукта после рефолдинга.

ВЫВОДЫ

Трехстадийная отмывка ТВ растворами мочевины позволила удалить не менее 60 % примесного материала практически без потери целевого продукта. Очистка рекомбинантного эктодомена EphA5 проведена с применением анионообменной и металл-хелатной хроматографии. Рефолдинг рекомбинантного ECD EphA5 осуществлен методом колоночной хроматографии на Ni-сефарозе.

Литература

1. Charmsazand S., Boyd A. Expression and function of the Eph receptor family in leukemia and hematopoietic malignancies: prospects for targeted therapies. // J. Leukemia. 2013. V. 1. I. 1. P. 1–9.
2. Gauthier L., Robbins S. Ephrin signaling: one raft to rule them all? One raft to sort them? One raft to spread their call and in signaling bind them? // Life Sciences. 2003. V. 74. P. 207–216.
3. Himanen J.-P., Nikolov D. Eph receptors and ephrins. // The international journal of biochemistry & cell biology. 2003. V. 35. P. 130–134.
4. Pasquale E.B. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signaling and beyond. // Nat. Rev. Cancer. 2010. V. 10. P. 165–180.
5. Adikari P.W., Lackmann M. Eph/ephrin signaling and function in oncogenesis: lessons from embryonic development. // Curr. Cancer Drug Targets. 2008. V. 8. P. 473–479.
6. Zozulya S., Udovichenko I. Eph family receptors as therapeutic targets. // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2012. Vol. 38. No. 3. P. 231–242.
7. Qin H., Shi J., Noberini R., Pasquale E., Song J. // Crystal structure and NMR binding reveal that two small molecule antagonists target the high affinity Ephrin-binding channel of the EphA4 receptor. The journal of biological chemistry. 2008. Vol. 283, No. 43. P. 29473–29484.
8. Guise A., West S., Chaudhuri S. // Protein folding in vivo and renaturation of recombinant proteins from inclusion bodies. Molecular Biotechnology. 1996. Vol. 6. P. 53–64.
9. Lindner P., Guth B., Wülfing C., Krebber C., Steipe B., Müller F., Plückthum A. Purification of native proteins from the cytoplasm and periplasm of *E.coli* using IMAC and Histidine tails: a comparison of proteins and protocols. // Methods: a companion to methods in enzymology. 1992. Vol. 4. P. 41–56.
10. Oganessian N., Kim S.-H., Kim R. On-column protein refolding for crystallization. // Journal of structural and functional genomics. 2005. Vol. 6. P. 177–182.
11. Peterson G.L. Determination of total protein // Methods in enzymology. 1983. Vol. 91. P. 95–119.
12. Жидецкий А.В. Оптимизация условий выделения и очистки рекомбинантного эктодомена эфрина рецептора типа A5 (ECD EphA5) из телец включения *E.coli*. // Сборник материалов 71 научной конференции студентов, магистрантов и аспирантов БГУ. 2014. Т.1. С.244–248.