

UDC 579.69 +577.112

Биоаффинный сорбент на основе иммобилизованного белка A *Staphylococcus aureus*: создание и использование

О. Б. Горбатюк, М. В. Цапенко², М. В. Павлова^{1,2}, О. В. Окунев^{1,2}, В. А. Кордюм^{1,2}

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко
Ул. Владимирская, 64, Киев, Украина, 01033

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина, 03680

²Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины
Ул. Красноармейская, 57/3, Киев, Украина, 03150

gorbatuik@ukr.net

Цель. Создание биоаффинного сорбента на основе ориентированно иммобилизованного белка A *Staphylococcus aureus* (SPA) через два целлюлозосвязывающих домена (CBD) *Clostridium thermocellum* и его применение для очистки антител. **Методы.** С использованием последовательностей ДНК, кодирующих SPA и два CBD, сконструирован ген слитного белка SPA-CBD₂ и обеспечено его получение в растворимой форме экспрессией в клетках *Escherichia coli*. Целевой белок иммобилизовали методом биоаффинного связывания на микрокристаллической целлюлозе. **Результаты.** Установлены такие характеристики биоаффинного сорбента, как емкость (1 мг SPA-CBD₂/1 мл целлюлозы), динамическая емкость (3 мг иммуноглобулинов мыши/1 мл сорбента) и продуктивность, а также показана его стабильность при долгосрочном хранении. С помощью биоаффинного сорбента выделены фракции иммуноглобулинов с чистотой более 95%. Определено, что очищенные таким способом антитела с высокой чувствительностью выявляют соответствующие антигены. **Выводы.** Предложенный биоаффинный сорбент позволяет получать очищенные функционально активные поли- и моноклональные антитела, а также проводить фракционирование на подклассы иммуноглобулинов G мыши.

Ключевые слова: антитела, белок A, целлюлозосвязывающий домен, иммобилизация белка, аффинная хроматография.

Введение. В настоящее время антитела широко применяют в биомедицинской практике и в фундаментальных исследованиях. Для получения значительных количеств антител с высокой степенью чистоты, как правило, используют комбинации отдельных методов, в частности, преципитацию этанолом и различные виды хроматографии: ионообменную, гидрофобных взаимодействий, металл-аффинную [1]. Однако эти методы неспецифические, к тому же применение некоторых из них приводит к частичной потере функциональной активности анти-

тел. Высокопродуктивным способом получения антител является аффинная хроматография с использованием сорбентов на основе иммобилизованных иммуноглобулинсвязывающих белков, в частности, рекомбинантного белка A *Staphylococcus aureus* (SPA). Этот метод широко применяют для получения фракций очищенных антител из культуральных и асцитных жидкостей, сывороток крови, а также для иммуносорбции аутоантител и циркулирующих иммунных комплексов из плазмы крови больных [2–4].

Особенностью строения SPA, обеспечивающей специфическое связывание с IgG разных видов жи-

вотных и человека, является наличие в его составе пяти доменов (E, D, A, B, C), каждый из которых способен специфически взаимодействовать с Fc-фрагментами антител [5]. Одна молекула SPA может связывать не менее двух молекул IgG. Несмотря на то, что для очистки антител применяют альтернативные низкомолекулярные синтетические лиганды, обладающие некоторой селективностью к IgG, степень их очистки значительно ниже, чем при использовании SPA. Ни один из известных низкомолекулярных лигандов не обеспечивает такой универсальности при очистке антител, как SPA [6].

Преимуществами SPA как биолиганда в биотехнологии являются его конформационная стойкость к действию физико-химических факторов и протеаз, сохранение функциональных свойств в широком диапазоне pH (2,0–11,0), возможность ренатурации после обработки денатурирующими растворами мочевины или гуанидингидрохлорида, а также отсутствие в его составе остатков цистеина, что значительно упрощает выделение и очистку SPA [7]. Кроме того, высокое родство к Fc-фрагментам антител и стабильность в сравнении с другими иммуноглобулинсвязывающими белками, используемыми в биотехнологии (белок G рода *Streptococcus* и белок L *Peptostreptococcus magnus*), позволяют позиционировать SPA как эффективный лиганд для очистки антител в условиях лаборатории и в промышленных масштабах [3, 8].

При создании аффинных сорбентов применяют разные стратегии иммобилизации белковых лигандов, в частности SPA, на хроматографических матрицах. Классическим методом является непрямая иммобилизация на химически активированных матрицах (активация бромцианом, карбонилдиимидазолом, N-гидроксисукцинимидом). Однако использование таких матриц в ряде случаев приводит к неспецифической иммобилизации лиганда и частичной потере его функциональной активности [9]. Кроме того, спрос на сорбенты подобного типа ограничивается их высокой себестоимостью.

Альтернативой иммобилизации на химически активированных матрицах является генно-инженерное введение в состав последовательности SPA в качестве белка-партнера целлюлозосвязывающего домена CBD (CBD – Cellulose Binding Domain) из цел-

люлозолитического комплекса *Clostridium thermocellum*, способного специфически взаимодействовать с углеводным остовом целлюлозы. Это обеспечивает ориентированную иммобилизацию белка на матрице и экспонирование активных центров связывания в положение, оптимальное для взаимодействия с иммуноглобулинами [10, 11]. В результате удается обойти трудности, возникающие при использовании химически активированных матриц.

В работе описано получение биоаффинного сорбента на основе ориентированно иммобилизованного SPA при помощи двух целлюлозосвязывающих доменов и его использование для очистки антител.

Материалы и методы. Использовали штаммы *Escherichia coli* XL1-blue, BL21 (DE3) и плазмидные векторы *pJET1.2* («Fermentas», Литва), *pGEM-11Zf*(«Promega», США), *pET-24* («Novagen», США).

Последовательности олигонуклеотидов для амплификации ДНК SPA и CBD (Gene Bank Accession N X68233) рассчитывали с помощью программы «Vector NTI» («Invitrogen», США) по гомологии с известной нуклеотидной последовательностью, представленной в базе данных GenBank BLAST Национального центра биотехнологической информации (NCBI). Олигонуклеотиды синтезированы фирмой «Синтол» (РФ).

Конструирование вектора экспрессии *pET-24-SPA-CBD2*. Для получения генно-инженерного тандема «CBD-CBD» использовали плазмиду *pCBD*, любезно предоставленную для исследований профессором Я. Шохамом (Израиль). ПЦР-амплификацию последовательности «CBD-CBD» проводили с применением двух пар специфических праймеров: 1) sn1: 5'-CATGCGGCCGCAGGCGGTGTCCG AAGGCGGTGGCAGCGAAGGTGGCGGCGCAAA TACACCGGTATCAGG-3', asn2: 5'-GTGGGATCC GGGTTCTTTACCCCATACAAGAACAC-3'; 2) sn3: 5'-CATGGATCCGGCGGTGGCTCCGAAGGCGGT GGCAGCGAAGGTGGCGGCGCAATACACCGG TATCAGG-3', asn4: 5'-GTGCTCGAGGGGTTCTTT ACCCCATACAAGAACAC-3'.

С помощью первой пары праймеров в состав ДНК одного CBD вводили последовательность линкера «-Gly3-Ser-Glu-Gly3-Ser-Glu-Gly3-» и сайты рестрикции *Bam*HI на 5'-конце и *Xho*I – на 3'-конце: ПЦР-продукт 1. Используя вторую пару, в состав

другого CBD встраивали ту же последовательность линкера, а также сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции *NotI* на 5'-конце и *BamHI* – на 3'-конце: ПЦР-продукт 2. ПЦР-продукты 1 и 2 (534 п. н. каждый) гидролизовали соответствующими рестриктазами и клонировали в плазмидный вектор *pGEM-11Zf* с получением плазмиды *pGEM-11Zf* (CBD₂), гидролизуемой в дальнейшем рестриктазами *NotI* и *XhoI* для получения фрагмента CBD-CBD. Последний лигировали с плазмидным вектором для экспрессии *pET24* и конструирования плазмиды *pET-24-CBD₂*.

ДНК-последовательность SPA амплифицировали из хромосомной ДНК *S. aureus*.

Для проведения ПЦР использовали пару праймеров: Sn-SPA: 5'-ATCATATGGCGCAACACGATGAAGCTCAAC-3' и Asn-SPA: 5'-ATGCGGCCGCTTCCTCTTTGGTGC-3', с помощью которых в состав последовательности SPA вводили сайты рестрикции *NdeI* и *NotI*.

Очищенный продукт амплификации SPA (~880 п. н.) субклонировали в плазмидный вектор *pET-24-CBD₂*, которым трансформировали клетки *E. coli* штамма BL21 (DE3).

Синтез SPA-CBD₂. Рекомбинантный SPA-CBD₂ экспрессировали в клетках *E. coli* согласно модифицированному протоколу аутоиндукции [12]. Локализацию SPA-CBD₂ определяли разделением растворимой и нерастворимой фракций белков клетки в 12 %-м ДСН-ПААГ [13].

Анализ связывания SPA-CBD₂ с различными типами полисахаридных матриц. Для связывания с фибриллярными целлюлозами (CFI, CFII), микрокристаллической гранулярной целлюлозой (CC31) («Whatman», Великобритания) и хитином («New England BioLabs», Великобритания) аликвоты SPA-CBD₂ (100 мкг) инкубировали в течение 1 ч с вышеуказанными матрицами (20 мкл), осаждали центрифугированием, промывали дистиллированной водой и анализировали в 12 %-м ДСН-ПААГ.

Для получения биоаффинного сорбента SPA-CBD₂ иммобилизовали на микрокристаллической целлюлозе CC31. Затем сорбент отмывали от неспецифически связавшихся белков буфером (500 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 20 мМ трис-HCl, pH 8,0) и хранили при температуре 4 °С в 20 %-м растворе этанола.

Очистка поликлональных антител с использованием биоаффинного сорбента. На хроматографическую колонку, содержащую 1 мл биоаффинного сорбента, уравновешенного буфером PBS (50 мМ Na₂HPO₄, 150 мМ NaCl, pH 8,0), наносили разбавленные тем же буфером сыворотки крови иммунизированных мышей. Скорость потока буфера равна 0,5 мл/мин. Сорбент промывали буфером PBS, связанные антитела элюировали 0,1 М Na-цитратным буфером, pH 3,8. Чистоту элюированных антител анализировали электрофорезом в 12 %-м ДСН-ПААГ.

ELISA. Антиген rhIFN-α2b (рекомбинантный интерферон человека α2b), предоставленный НПК «ФармБиотек» (Украина) иммобилизовали в лунках полистиролового планшета (10 мкг/мл) («Nunc», Дания). После блокирования мест неспецифического связывания в лунки вносили предварительно очищенные на биоаффинном сорбенте поликлональные антитела к rhIFN-α2b и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37 °С. Иммунные комплексы детектировали с помощью вторичных антимышиных антител («ИМТЕК», РФ), конъюгированных с пероксидазой хрена. В качестве хромогенного субстрата использовали раствор ТМВ («Sigma», США). Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета программ «Origin»7.0.

Применение биоаффинного сорбента для фракционирования IgG мыши. Хроматографическую колонку, содержащую 1 мл биоаффинного сорбента, присоединяли к автоматизированной системе FPLC («Pharmacia», США). Уравновешивали буфером для нанесения (1,5 М глицин, 3 М NaCl, pH 8,9) и наносили сыворотки крови мышей, разбавленные тем же буфером. Скорость потока буфера составляет 0,5 мл/мин. Сорбент промывали буфером для нанесения до выхода пера самописца на изолинию. Связанные антитела элюировали с использованием буферных растворов: 0,1 М Na-фосфат, pH 6,0; 0,1 М Na-цитрат, pH 4,5 и 0,1 М Na-цитрат, pH 3,5. Чистоту и концентрацию полученных в результате элюции антител анализировали электрофорезом в 12 %-м ДСН-ПААГ.

Для определения изотипов IgG использовали набор IsoQuick Kit for Mouse Monoconal Isotyping («Sigma»).

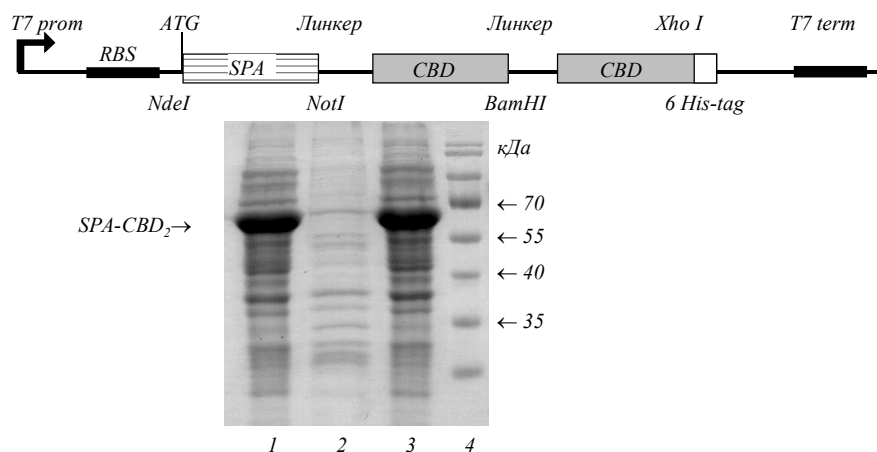


Рис. 1. Схематическое изображение касеты для экспрессии рекомбинантного слитного белка SPA-CBD₂ (а) и электрофореграмма лизатов клеток *E. coli*, в которых индуцировали синтез SPA-CBD₂ (б: 1 – суммарный лизат белков клеток продуцента; 2 – фракция нерастворимых белков клетки; 3 – фракция растворимых белков клетки; 4 – белки – маркеры молекулярной массы). На дорожки нанесено по 20 мкл культуры

Результаты и обсуждение. Известно, что критерием, определяющим емкость сорбента, является плотность посадки лиганда на матрице. При этом динамическая емкость сорбента обусловлена ориентацией лиганда и доступностью его активного центра. Поэтому наиболее целесообразно проводить прямую иммобилизацию лиганда. Основной способ осуществления такой иммобилизации – это введение на генном уровне в состав белка-лиганда добавочной тиогруппы или адаптерной молекулы [14, 15].

В данной работе для иммобилизации SPA использован адаптерный белок CBD, выделенный из целлюлозолитического комплекса *C. thermocellum*, обеспечивающий аффинное связывание белка на полисахаридной матрице [10]. Для получения генно-инженерным методом слитного белка SPA-CBD₂ проведен интерактивный дизайн в соответствии с особенностями структуры белков-партнеров и топологией их активных центров [16, 17]. Определено, что оптимальным является дизайн химерного белка, в котором на N-конце находится SPA, а на C-конце – два CBD, соединенных между собой гибкими линкерными последовательностями: «-Gly3-Ser-Glu-Gly3-Ser-Glu-Gly3-». Такое взаиморасположение обеспечивает пространственную доступность иммуноглобулинсвязывающих центров SPA для взаимодействия с Fc-доменами антител. Введение в состав рекомбинантного белка не одного, а двух последовательностей CBD обусловлено необходимостью усиления аффинности связывания рекомбинантного белка SPA-CBD₂ с целлюлозой [18]. Для проведения хроматографической очистки SPA-

CBD₂ в его состав введена C-концевая последовательность олигогистидиновой метки 6His-tag (рис. 1, а).

Для создания рекомбинантного белка SPA-CBD₂ ДНК-последовательность, кодирующую SPA, амплифицировали с хромосомной ДНК *S. aureus*. Размер амплифицированного фрагмента ДНК составляет 880 п. н., что отвечает аминокислотной последовательности пятидоменного SPA. Секвенирование выявило его полное соответствие последовательности SPA, представленной в базе данных GenBank (Accession N EU695225.1) NCBI. Полученную последовательность ДНК, кодирующую SPA, субклонировали в плазмидный вектор *pET-24-CBD₂*, которым трансформировали *E. coli* штамма BL21 (DE3). Важно отметить, что полученный нами продуцент рекомбинантного белка SPA-CBD₂ (*E. coli* штамма BL21 (DE3)) был достаточно стабильным при длительном хранении (не менее одного года).

Белок SPA-CBD₂ получен бактериальной экспрессией по модифицированному протоколу аутоиндукции. Установлено, что SPA-CBD₂ накапливается в цитоплазме в растворимом виде (рис. 1, б). Уровень его экспрессии составляет ~0,5 г/л (рис. 1, б) культуры *E. coli*, что почти в 80 раз выше, чем в работе Шосеева и др. [19]. По результатам связывания CBD с целлюлозой и SPA с иммуноглобулинами показано функциональную активность обоих белков-партнеров SPA-CBD₂.

Следующим этапом нашей работы стал выбор хроматографической матрицы для создания биоаффинного сорбента. Поскольку CBD обладает аффинностью к целлюлозе, для анализа связывания использовали разные типы целлюлоз (микрористал-

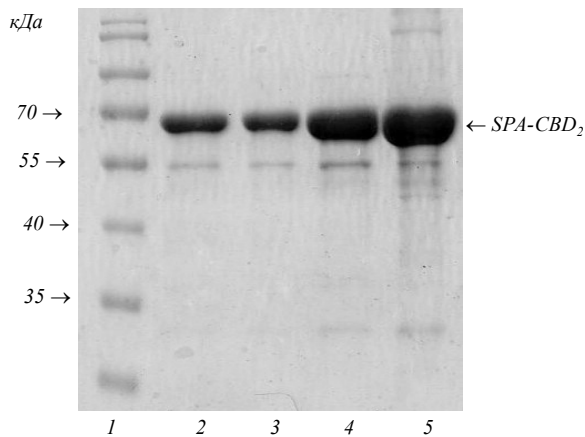


Рис. 2. Электрофореграмма SPA-CBD₂ после связывания с различными типами полисахаридных матриц: 1 – белки – маркеры молекулярной массы; 2, 3 – фибриллярная целлюлоза CFI и CFII соответственно; 4 – микрокристаллическая целлюлоза CC31; 5 – хитин. На дорожки нанесено по 3 мкл сорбента

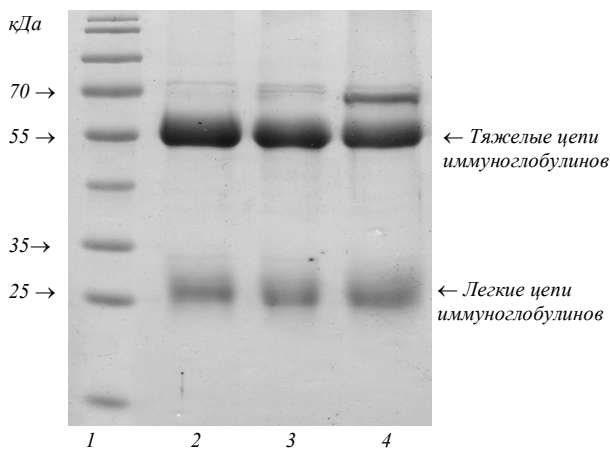


Рис. 3. Электрофореграмма фракций антител, очищенных на биоаффинном сорбенте, полученных при элюции буферными растворами с разными значениями pH: 1 – белки – маркеры молекулярной массы; 2 – элюция Na-цитратным буфером, pH 3,8; 3 – элюция глициновым буфером, pH 3,0; 4 – элюция 2 М аргинином, pH 4,3

лическую и фибриллярную), а также хитин. Проведенные эксперименты по связыванию показали, что емкость SPA-CBD₂ для этих сорбентов колеблется в диапазоне от 0,4 (для CFI) до 1,2–1,5 мг/мл (для CC31 и хитина) (рис. 2). Исходя из этого для получения биоаффинного сорбента SPA-CBD₂ иммобилизовали на целлюлозе CC31 и хитине.

Из литературы известно, что в результате аффинного взаимодействия CBD с целлюлозой формируется стабильный комплекс. Это происходит вследствие гидрофобных взаимодействий некоторых аминокислотных остатков домена с углеводо-

родным остовом целлюлозной матрицы [17]. Ранее показано, что одним из недостатков биоаффинного метода иммобилизации гибридного белка на носителе является частичная диссоциация комплекса в кислых условиях (pH 3,0) и ее усиление при дальнейшем понижении pH до 2,0. Последнее приводит к снижению чистоты конечного продукта и сужает диапазон возможных условий элюции [11]. Для решения этой проблемы в состав гибридного белка SPA-CBD₂ ввели генно-инженерный тандем CBD-CBD, что позволило усилить его связывание на матрице [18].

Далее нужно было определить условия элюции, обеспечивающие селективную диссоциацию антител и вместе с тем не вызывающие стекания лиганда. При этом использовали следующие растворы для элюции: 0,1 М глицин, pH 3,0; 0,1 М Na-цитратный буфер, pH 3,8 и 2 М аргинин, pH 4,3 [20]. После электрофоретического разделения полученных элюатов установлено, что только 2 М аргинин вызывает значительное стекание иммобилизованного SPA-CBD₂ в элюат. При использовании глицинового и цитратного буферов конечный продукт полностью элюируется с высокой степенью чистоты. Исходя из этого последующие очистки проводили с помощью цитратного буфера, pH 3,8 (рис. 3).

Полученный биоаффинный сорбент использовали при очистке антител из сывороток крови и асцитных жидкостей мышей (данные не приведены). Для этого в аналитическую колонку объемом 1 мл вносили 3 мл 30 %-й суспензии CC31-SPA-CBD₂. После уравнивания сорбента фосфатно-солевым буфером наносили разведенные сыворотки иммунизированных рекомбинантным IFN- α 2b мышей, отмывали от неспецифически связавшихся белков и элюировали антитела Na-цитратным буфером, pH 3,8. В результате получены IgG с высокой степенью чистоты (более 95 %) (рис. 4). Динамическую емкость биоаффинной колонки по связыванию антител находили, определяя концентрацию очищенных антител. Установлено, что она составляет 3 мг мышинных антител на 1 мл осажденного биоаффинного сорбента. Также показана неизменность функциональных характеристик биоаффинного сорбента при хранении его на протяжении не менее одного года при температуре 4 °C и возможность повторного

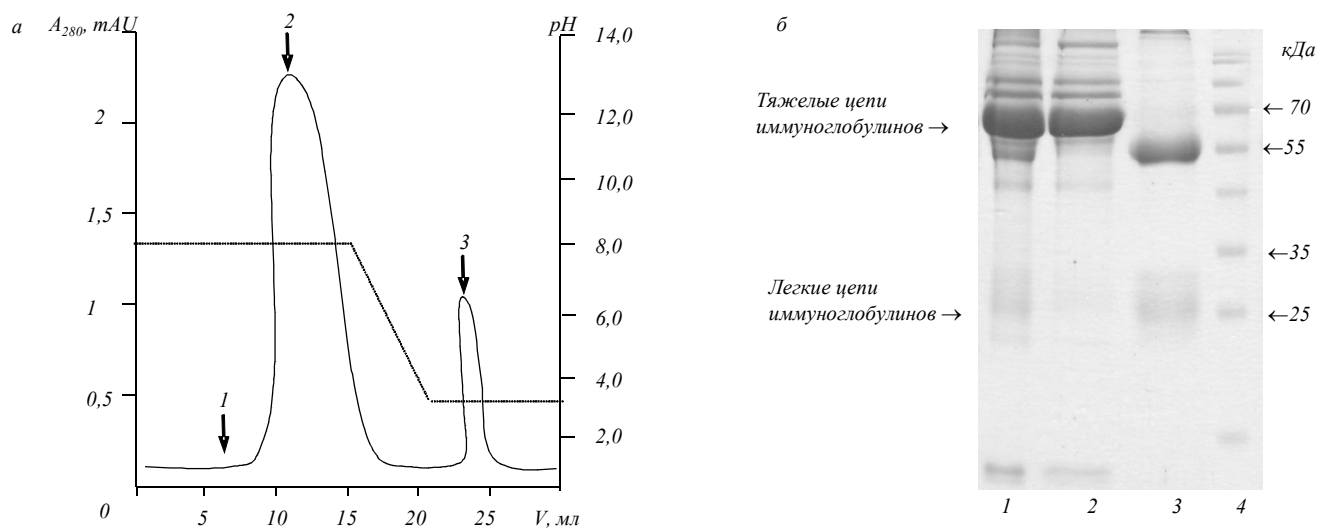


Рис. 4. Очистка поликлональных антител против IFN- α 2b человека из сывороток крови иммунизированных мышей на биоаффинном сорбенте: а – хроматограмма (1 – нанесение белков сывороток крови иммунизированных мышей; 2 – белки, удаляемые при промывании сорбента; 3 – элюция связанных антител); б – электрофореграмма фракций белков (1 – нанесение белков сывороток крови иммунизированных мышей; 2 – белки, удаляемые при промывании сорбента; 3 – хроматографически очищенная фракция поликлональных антител против IFN- α 2b человека; 4 – маркеры молекулярной массы)

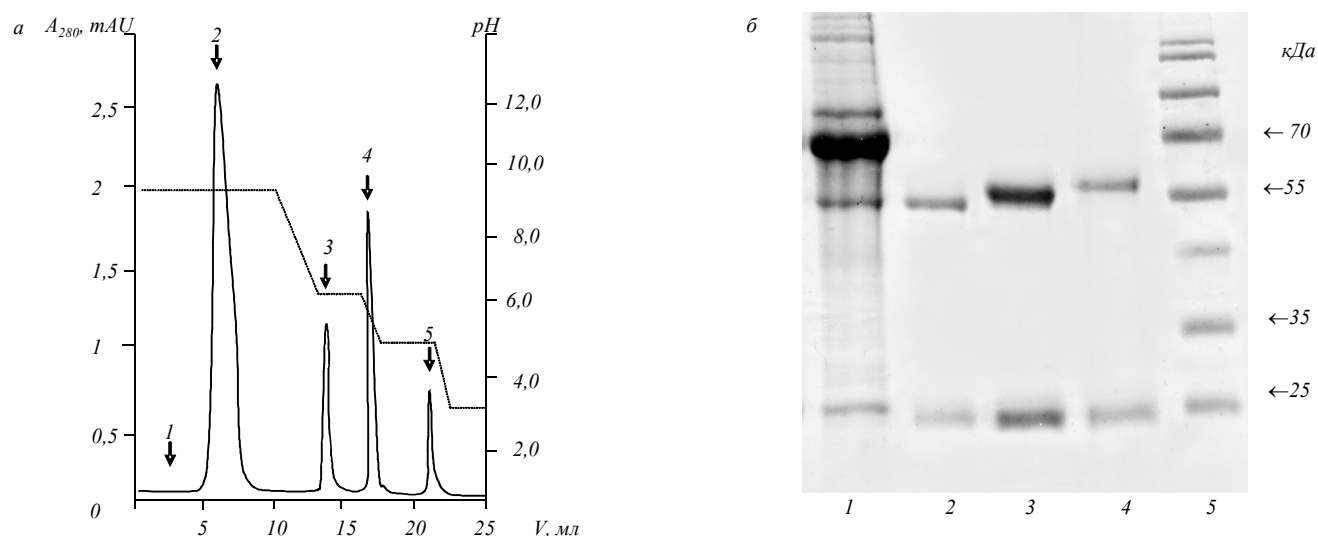


Рис. 5. Фракционирование подклассов IgG мыши на биоаффинном сорбенте: а – хроматограмма (1 – нанесение белков сывороток крови; 2 – белки, удаляемые при промывании сорбента буфером; 3–5 – элюция связанных антител буферными растворами, содержащими 0,1 М Na-фосфат, pH 6,0 (3); 0,1 М Na-цитрат, pH 4,5 (4) и 0,1 М Na-цитрат, pH 3,5 (5)); б – электрофореграмма фракций белков (1 – нанесение белков сывороток крови иммунизированных мышей; 2–4 – очищенные фракция антител, полученные в результате градиентной элюции; 5 – белки – маркеры молекулярной массы)

использования для нескольких циклов очистки антител без снижения динамической емкости.

Изучение формирования комплекса белка А с иммуноглобулинами показало, что главную роль в связывании SPA с IgG играют гидрофобные взаимодействия между α -спиралью I SPA и Fc-домена-

ми IgG (более 80% свободной энергии связывания), в то время как селективность SPA к разным подклассам IgG определяют электростатические взаимодействия между α -спиралью II SPA и Fc-доменами IgG (20%) [21]. Поэтому применение буферных растворов с высокой концентрацией соли для по-

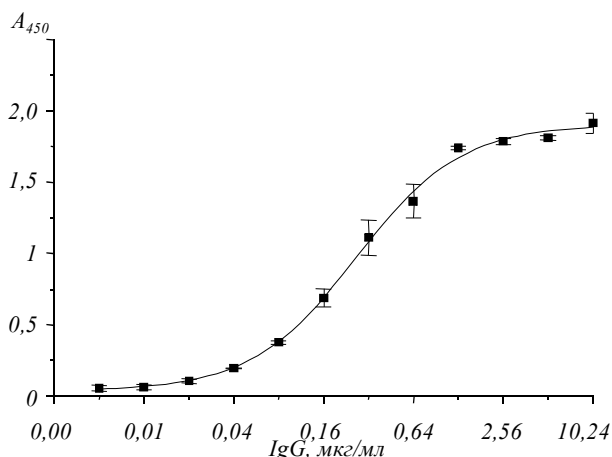


Рис. 6. Кривая связывания очищенных на биоаффинном сорбенте поликлональных антител с rhIFN- α 2b антигеном при использовании метода ELISA ($M \pm m$; $n = 3$)

ссадки IgG на колонку способствует их более полному связыванию с SPA. Следует отметить, что сорбенты на основе SPA IgG элюируются в более мягких условиях, нежели при использовании других аффинных сорбентов (например, сорбенты с иммобилизованным белком G). Это обеспечивает получение чистых фракций иммуноглобулинов без существенной потери их функциональной активности. Исходя из того, что SPA имеет разную аффинность к определенным изотипам мышинных IgG, последние фракционировали на подклассы в результате поочередного снижения величины pH элюирующего буфера: IgG1 элюировали при pH 6,0; IgG-2a – pH 4,5; IgG-2b – pH 3,5 (рис. 5). Наличие в элюатах преимущественно определенных подклассов IgG мыши подтверждали, используя IsoQuick Kit for Mouse Monoclonal Isotyping. Также известно, что человеческие IgG1, IgG2, IgG4 взаимодействуют с SPA с константой аффинности $K_A = 10^8 \text{ M}^{-1}$, в то время как IgG3 демонстрируют слабое связывание с SPA. Это позволяет выделить IgG3 среди остальных подклассов иммуноглобулинов G человека.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования сконструированного нами биоаффинного сорбента для высокоэффективной очистки и фракционирования поли- и моноклональных антител из сложных биологических смесей в условиях лаборатории. Очищенные на биоаффинном сорбенте антитела оказались стабильными при хранении и достаточно чув-

ствительными при детекции соответствующих антигенов методом ELISA (рис. 6). Кроме того, целлюлоза – недорогой и доступный материал, не требующий дополнительных химических модификаций, что служит еще одним подтверждением правильности выбранного направления исследований.

O. B. Gorbatyuk, M. V. Tsapenko¹, M. V. Pavlova^{1,2}, O. V. Okunev^{1,2}, V. A. Kordium^{1,2}

Bioaffinity sorbent based on immobilized protein A *Staphylococcus aureus*: development and application

Taras Shevchenko National University of Kyiv
64, Volodymyrska Str., Kyiv, Ukraine, 01033

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03680

²State Institute of Genetic and Regenerative Medicine, NAMS of Ukraine
57/3, Chervonoarmijska Str., Kyiv, Ukraine, 03150

Summary

Aim. The obtaining of bioaffinity sorbent based on the immobilized protein A of *S. aureus* (SPA) using two cellulose-binding domains (CBD), and its application for purification of antibodies. **Methods.** The DNA sequences encoding SPA and two CBD were genetically fused, expressed in the high-productive *Escherichia coli* system and the protein SPA-CBD₂ was obtained in a soluble form. The SPA-CBD₂ fusion protein was affinity immobilized on the microcrystalline cellulose. **Results.** Capacity of bioaffinity sorbent (1 mg SPA-CBD₂/1 ml CC31-cellulose), dynamic capacity (3 mg mouse IgG/1 ml bioaffinity sorbent), efficiency and stability during prolonged storage were determined. The bioaffinity sorbent was used for purification of antibodies. The purity of antibodies in eluted fractions was more than 95%. The purified antibodies detected target antigens with a high sensitivity. **Conclusions.** The designed bioaffinity sorbent provides obtaining pure polyclonal and monoclonal antibodies in functionally active form and can be useful for the fractionation of mouse immunoglobulin G.

Keywords: antibodies, protein A, cellulose-binding domain, protein immobilization, affinity chromatography.

O. B. Горбатюк, М. В. Цапенко, М. В. Павлова, О. В. Окунев,
В. А. Кордюм

Біоафінний сорбент на основі іммобілізованого білка
A *Staphylococcus aureus*: створення і використання

Резюме

Мета. Створення біоафінного сорбента на основі орієнтовано іммобілізованого білка A *Staphylococcus aureus* (SPA) через два целюлозові зв'язувальні домени (CBD) *Clostridium thermocellum* та його застосування для очищення антитіл. **Методи.** З використанням послідовностей ДНК, кодуючих SPA і два CBD, сконструйовано ген злитого білка SPA-CBD₂ та забезпечено його отримання в розчинній формі експресією у клітинах *Escherichia coli*. Цільовий білок іммобілізовано методом біоафінного зв'язування на мікрокристалічній целюлозі. **Результати.** Встановлено такі характеристики біоафінного сорбента, як ємність (1 мг SPA-CBD₂/1 мл целюлози), динамічна ємність (3 мг імуноглобулінів м-

ції/1 мл сорбента) і продуктивність, а також показано його стабільність при тривалому зберіганні. За допомогою біоафінного сорбента виділено фракції імуноглобулінів з чистотою понад 95%. Визначено, що очищені у такий спосіб антитіла з високою чутливістю виявляють відповідні антигени. **Висновки.** Запропонований біоафінний сорбент дозволяє отримувати очищені функціонально активні полі- і моноклональні антитіла, а також проводити фракціонування на підкласи імуноглобулінів G миші.

Ключові слова: антитіла, білок А, целюлозов'язувальний домен, іммобілізація білка, афінна хроматографія.

REFERENCES

1. Denizli A. Purification of antibodies by affinity chromatography // Hacettepe J. Biol. Chem.–2011.–**39**, N 1.–P. 1–18.
2. Boi C., Dimartino S., Sarti G. C. Performance of a new protein A affinity membrane for the primary recovery of antibodies // Biotechnol. Prog.–2008.–**24**, N 3.–P. 640–647.
3. Hober S., Nord K., Linhult M. Protein A chromatography for antibody purification // J. Chromatogr. B. Analyt Technol. Biomed. Life Sci.–2007.–**848**, N 1.–P. 40–47.
4. Hickstein H., Korten G., Bast R., Barz D., Templin R., Schneidewind J. M., Kittner C., Nizze H., Schmidt R. Protein A immunoadsorption (i. a.) in renal transplantation patients with vascular rejection // Transfus. Sci.–1998.–**19**–P. 53–57.
5. Moks T., Abrahmsen L., Nilsson B., Hellman U., Sjoquist J., Uhlen M. Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains // Eur. J. Biochem.–1986.–**156**, N 3.–P. 637–643.
6. Ghose S., Hubbard B., Cramer S. M. Evaluation and comparison of alternatives to Protein A chromatography mimetic and hydrophobic charge induction chromatographic stationary phases // J. Chromatogr. A.–2006.–**1122**, N 1–2.–P. 144–152.
7. Gottschalk U. Process scale purification of antibodies.–Hoboken: Wiley & Sons, 2009.–430 p.
8. Housden N. G., Harrison S., Roberts S. E., Beckingham J. A., Graille M., Stura E., Gore M. G. Immunoglobulin-binding domains: Protein L from *Peptostreptococcus magnus* // Biochem. Soc. Trans.–2003.–**31**, Pt 3.–P. 716–718.
9. Affinity chromatography: methods and protocols / Eds P. Bailon et al.–New York: Humana press, 2000.–Vol. 147.–230 p.
10. Morag E., Lapidot A., Govorko D., Lamed R., Wilchek M., Bayer E. A., Shoham Y. Expression, purification, and characterization of the cellulose-binding domain of the scaffoldin subunit from the cellulosome of *Clostridium thermocellum* // Appl. Environ. Microbiol.–1995.–**61**, N 5.–P. 1980–1986.
11. Gilchuk P. V., Volkov G. L. Immobilization of mouse single-chain antibodies for affinity chromatography using the cellulose-binding protein // Ukr. Biokhim. Zhur.–2006.–**78**, N 4.–P. 160–163.
12. Studier F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures // Protein Expr. Purif.–2005.–**41**, N 1.–P. 207–234.
13. Westermeier R. Electrophoresis in practice: a guide to methods and application of DNA and protein separations.–Weinheim: VCH, 1997.–331 p.
14. Ljungquist C., Jansson B., Moks T., Uhlen M. Thiol-directed immobilization of recombinant IgG-binding receptors // Eur. J. Biochem.–1989.–**186**, N 3.–P. 557–561.
15. Linhult M., Gulich S., Graslund T., Nygren P. A., Hober S. Evaluation of different linker regions for multimerization and coupling chemistry for immobilization of a proteinaceous affinity ligand // Protein Eng.–2003.–**16**, N 12.–P. 1147–1152.
16. Atkins K. L., Burman J. D., Chamberlain E. S., Cooper J. E., Poutrel B., Bagby S., Jenkins A. T., Feil E. J., van den Elsen J. M. S. aureus IgG-binding proteins SpA and Sbi: host specificity and mechanisms of immune complex formation // Mol. Immunol.–2008.–**45**, N 6.–P. 1600–1611.
17. Tormo J., Lamed R., Chirino A. J., Morag E., Bayer E. A., Shoham Y., Steitz T. A. Crystal structure of a bacterial family-III cellulose-binding domain: a general mechanism for attachment to cellulose // EMBO J.–1996.–**15**, N 21.–P. 5739–5751.
18. Lidner M., Salovuori I., Ruohonen L., Teeri T. T. Characterization of a double cellulose-binding domain: synergistic high-affinity binding to crystalline cellulose // J. Biol. Chem.–1996.–**271**, N 35.–P. 21268–21272.
19. Pat. USA N 5837814. 1998. Cellulose binding domain proteins / O. Shoseyov, K. Yosef, I. Shpiegl, M. Goldstein, R. Doi.
20. Arakawa T., Philo J. S., Tsumoto K., Yumioka R., Ejimac D. Elution of antibodies from a Protein-A column by aqueous arginine solutions // Protein Expr. Purif.–2004.–**36**, N 2.–P. 244–248.
21. Huang B., Liu F. F., Dong X. Y., Sun Y. Molecular mechanism of the affinity interactions between protein A and human immunoglobulin G1 revealed by molecular simulations // J. Phys. Chem. B.–2011.–**115**, N 14.–P. 4168–4176.

Received 15.01.12