

Ренатурація химерного білка ScFv-CBD з тілець включення *Escherichia coli*

О. Б. Горбатюк¹, Ю. С. Ніколаєв¹, Д. М. Іродов, І. Я. Дубей, П. В. Гільчук

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, 01003, Україна

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна

gilchuk@ukr.net

Запропоновано ефективний і недорогий метод ренатурації химерного білка ScFv-CBD із тілець включення E. coli. Метод ґрунтується на ступінчастому розведенні солюбілізованого в розчині 6 M гуанідингідрохлориду ScFv-CBD буфером для ренатурації, який містить L-аргінін та глутатіон. Досліджено вплив вихідної концентрації білка та різного співвідношення реагентів окисно-відновної пари GSSG:GSH, які додавали на певних стадіях ренатурації, на вихід функціонально активного ScFv-CBD і його агрегацію. Показано, що зниження виходу активного ScFv-CBD відбувається за рахунок формування значної кількості його розчинних агрегатів при вихідній концентрації, вищій за 0,53 мг/мл. Визначено умови ренатурації, які забезпечують найбільший вихід розчинного ScFv-CBD у мономерній формі, та найвищу функціональну активність його антигенів'язувального (ScFv) і целюлозов'язувального (CBD) компонентів (відповідно ~63 і ~96 %).

Ключові слова: химерний білок, тілець включення, ренатурація, одноланцюгові антитіла, целюлозов'язувальний домен.

Вступ. На сьогодні рівень розвитку генно-інженерних технологій забезпечує широкі можливості для одержання рекомбінантних білків, які мають важливе практичне значення, методом бактеріального синтезу. У багатьох випадках при експресії гетерологічних генів у клітинах *E. coli* спостерігається агрегація синтезованих білків, що призводить до утворення цитоплазматичних тілець включення. Використання таких продуцентів створює певні складнощі, пов'язані з необхідністю виділення цільового білка ренатурацією у функціонально активній формі для подальшого застосування в структурних або біохімічних дослідженнях. Кожен індивідуальний білок потребує емпіричного пошуку адаптованих схем ренатурації. У разі білків, які

містять декілька доменів або/і дисульфідні містки, проблема ускладнюється необхідністю відновлення активності кожного функціонального компонента та коректним паруванням SH-груп [1–3]. До таких білків належать рекомбінантні антитіла, які надзвичайно широко використовують як альтернативу Mabs для терапії і діагностики різних захворювань, а також у фундаментальних медико-біологічних дослідженнях [4]. Найпоширенішим форматом для конструювання і експресії в *E. coli* є одноланцюгові антитіла ScFv's (single-chain Fv-antibodies), які одержують трансляцією об'єднаних в один ген послідовностей варіабельних (V) доменів важкого і легкого ланцюгів вихідного антитіла [5].

У наш час не існує єдиного і універсального способу продукування ScFv's в *E. coli*, оскільки його вибір у кожному випадку визначається певними

О. Б. ГОРБАТЮК, Ю. С. НИКОЛАСВ, Д. М. ІРОДОВ, І. Я. ДУБЕЙ,
П. В. ГІЛЬЧУК, 2008

практичними вимогами і подальшим застосуванням цільового продукту. Досить поширеною стратегією біосинтезу ScFv's є використання лідерного пептиду для секреції у периплазму *E. coli*. Секреторна експресія сприяє накопиченню ScFv's у розчинній і функціональній формі, що досягається за рахунок формування дисульфідних зв'язків обох варіабельних доменів за участі певних периплазматичних факторів [6–7]. Проходження коректного фолдингу ScFv's у периплазмі є «вузьким» етапом секреторної експресії, що лімітує швидкість їхнього накопичення у нативному стані і відповідно вихід цільового продукту [8].

Альтернативною стратегією продукування ScFv's в *E. coli* є накопичення їх у цитоплазматичних тільцях включення. Останнє досягається видаленням сигнальної послідовності та використанням для експресії сильного промотору [9]. Перевагами такого синтезу є високий рівень накопичення цільового білка, а також спрощені процедури його виділення і очищення. Зазначений підхід є перспективним для великомасштабного одержання ScFv's, однак на сьогодні промислове його використання обмежене відсутністю універсальних схем ренатурації, низьким виходом функціонально активного продукту і високою собівартістю. Це, в свою чергу, стимулює розробку ефективніших і дешевших методів ренатурації [10].

У попередніх роботах нами описано створення бактеріальних надпродуцентів химерного білка ScFv-CBD, який при експресії накопичується у цитоплазматичних тільцях включення, та показано використання ренатурованого ScFv-CBD як афінного імуносорбенту [11, 12]. Мета даної роботи полягала в оптимізації лабораторного методу ренатурації ScFv-CBD для забезпечення високого його виходу у функціонально активній формі.

Матеріали і методи. *Виділення та очищення тілець включення.* Нарощування бактеріальної культури та індукування експресії ScFv-CBD проводили, як описано в роботі [11]. Осаджені центрифугуванням клітини продуцента суспендували в буфері TE (20 мМ трис-НСl, рН 8,0, 1 мМ ЕДТА), який містив 1 мг/мл лізоциму («Sigma», США), та інкубували протягом 20 хв на льоду. Для руйнування хромосомної ДНК одержаний клітинний лізат

обробляли ультразвуком, фракцію нерозчинних білків виділяли центрифугуванням (5000 g, 5 хв). Тільця включення частково очищували кількома послідовними промиваннями буфером TE з 0,3 %-м дезоксихолатом натрію, для чого осад повністю суспендували на ультразвуковому дезінтеграторі з наступним відділенням фракції нерозчинного білка центрифугуванням. Одержані тільця включення зберігали при -70°C .

Очищення ScFv-CBD. Фракцію тілець включення суспендували в буфері для денатурації А (20 мМ трис-НСl, рН 8,0, 200 мМ NaCl, 6 М гуанідингідрохлорид (ГГХ), 10 мМ 2-меркаптоетанол) і інкубували протягом 1 год при кімнатній температурі. Нерозчинний матеріал відокремлювали фільтрацією через 0,45-мкм мембранний фільтр («Millipore», США). Для очищення солюбілізованого білка ScFv-CBD використовували метод іммобілізаційної металафінної хроматографії (IMAX). Солюбілізований ScFv-CBD очищували на колонці Hi Trap Chelating HP (16/25) («GE Healthcare», США) з 5 мл сорбенту Ni-IDA Chelating Sepharose. Колонку врівноважували і промивали буфером А без 2-меркаптоетанолу, зв'язаний білок елюювали буфером Б (100 мМ трис-НСl, рН 8,0, 200 мМ NaCl, 6 М ГГХ, 500 мМ імідазол). Концентрацію очищеного ScFv-CBD розраховували за вмістом SH-груп (п'ять залишків цистеїну на молекулу ScFv-CBD), використовуючи для їхнього титрування метод Елмана. Гомогенність очищеного препарату аналізували електрофорезом в 15 %-му поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (ДСН-ПААГ).

Ренатурація ScFv-CBD. Ренатурацію проводили із застосуванням раніше розробленого нами методу ступінчастого розведення [10]. Буфером для денатурації (див. вище) концентрацію очищеного химерного білка доводили до 0,26–1,06 мг/мл, пробу охолоджували на льоду і швидко розводили при інтенсивному перемішуванні охолодженим до температури 4°C буфером для ренатурації В (100 мМ трис-НСl, рН 8,0, 200 мМ NaCl, 1 мМ ЕДТА) до встановлення 3 М концентрації ГГХ. Концентрацію ГГХ надалі знижували постадійним розведенням розчину білка буфером В таким чином, щоб забезпечити встановлення певних концен-

траційних ступенів ГГХ: 3 М 2 М 1 М 0,5 М. На етапах 2 М 1 М та 1 М 0,5 М до складу буфера В додавали L-аргінін до кінцевої його концентрації 0,4 М та глутатіон в окисненій і відновленій формах (GSSG:GSH, «Sigma»). Молярне співвідношення ScFv-CBD:GSSG в усіх експериментах становило 1:50, у той час як співвідношення GSSG:GSH варіювало в межах від 1:5 до 1:0.

Електрофорез білків. Електрофорез білків проводили за методом Лемлі, використовуючи для їхнього розділення 15 %-й ДСН-ПААГ [13]. Кількість та вміст (у відсотках) ScFv оцінювали методом денситометрії електрофореграм з наступним їхнім аналізом за допомогою програми TotalLab. Стандартом для побудови калібрувальної кривої слугував рекомбінантний інтерферон 2b людини (rhIFN- 2b) з відомою концентрацією.

Гель-хроматографія (Size Exclusion Chromatography, SEC). Білки фракціонували на колонці Superdex-75 (10/300) GL («GE Healthcare») з використанням автоматизованого хроматографа FPLC («GE Healthcare»). Сорбент урівноважували фосфатно-сольовим буфером (PBS), швидкість потоку елюента при хроматографії становила 0,2 мл/хв. Колонку калібрували сумішшю білків-маркерів з відомою молекулярною масою.

Зв'язування ScFv з IFN- 2b. В лунках полістиролового планшета для ELISA («Titertek», США) послідовно розводили проби, які містили ренатурований ScFv-CBD. Після блокування місць неспецифічного зв'язування вносили rhIFN- 2b (ВНДК «Фарм Біотек», Україна) в концентрації 10 мкг/мл та інкубували протягом 1 год за температури 37 °С. Далі лунки промивали буфером PBS, який містив 0,1 % твіну-20 (PBST), вносили очищені поліклональні антитіла миші проти rhIFN- 2b та вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому («ІМТЕК», РФ).

Утворені імунні комплекси проявляли за допомогою хромогенного субстрату ТМВ («Sigma»). Після розвитку забарвлення реакцію зупиняли додаванням 1 М сірчаної кислоти і вимірювали величину адсорбції A_{450} на багатоканальному фотометрі Multiscan MCC/340 («Titertek»).

Статистичну обробку результатів здійснювали з використанням пакету програм «Origin 7».

Визначення ефективності ренатурації ScFv-компонента химерного білка (E_1). До 50 мкл одержаного афінного сорбенту, який містив 40–75 мкг іммобілізованого ScFv-CBD, вносили надлишок очищеного rhIFN- 2b (100–150 мкг) та інкубували упродовж 60 хв при постійному перемішуванні. Сорбент осаджували центрифугуванням і промивали послідовно буфером В та дистильованою водою. Усі зв'язані з сорбентом білки елюювали, прогріваючи при температурі 100 °С у розчині, який містив 4 М сечовину, 0,1 %-й ДСН, 0,1 М 2-меркаптоетанол. Елюйовані білки розділяли в 15 %-му ДСН-ПААГ.

Для оцінки молярного співвідношення ScFv-CBD/rhIFN- 2b в імунних комплексах одержані електрофореграми сканували та аналізували з використанням програми TotalLab. Ефективність ренатурації ScFv-компонента розраховували за формулою

$$E_1 (\%) = \frac{100 m_{rhIFN-2b} M_{ScFv-CBD}}{m_{ScFv-CBD} M_{rhIFN-2b}},$$

де m – кількість відповідного білка, визначена за результатами денситометрії; M – молекулярна маса білка.

Визначення ефективності ренатурації CBD-компонента химерного білка (E_2). До розчину ренатурованого ScFv-CBD вносили суспензію мікрогранульованої целюлози CC31 («Whatman», Велика Британія) із розрахунку 1 мл CC31 на 1 мг білка. Афінне зв'язування ScFv-CBD проводили при постійному перемішуванні суспензії протягом 1 год. Повноту іммобілізації білка контролювали, вимірюючи його концентрацію в супернатанті через певні інтервали часу. Для розрахунку кількості іммобілізованого ScFv-CBD (у мкг білка/мл CC31) його елюювали з 5 мкл целюлози розчином такого складу: 6 М сечовина, 0,1 %-й ДСН, 0,1 М 2-меркаптоетанол. Після розділення в 15 %-му ДСН-ПААГ одержані електрофореграми сканували та аналізували з використанням програми TotalLab. Ефективність ренатурації CBD-компонента розраховували за відсотком зв'язаного з целюлозою ScFv-CBD після ренатурації.

Результати і обговорення. Кожен індивідуальний білок потребує специфічних умов ренатурації,

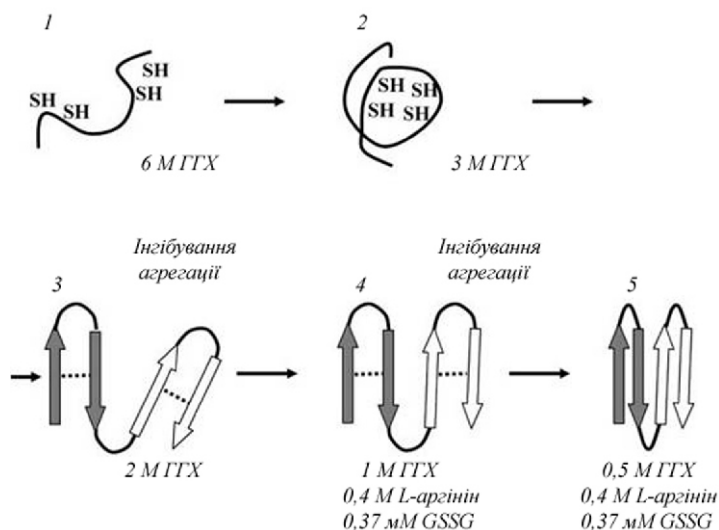


Рис. 1. Етапи формування нативної структури солюбілізованих ScFv's при ступінчастому зниженні концентрації гуанідингідрохлориду (ГТХ) (за [15]): 1 – солюбілізований білок; 2 – зближення SH-груп V-доменів; 3 – формування дисульфідних містків; 4 – асоціювання V-доменів, які містять частково сформовані елементи вторинної/третинної структури; 5 – компактизація V-доменів і формування антигензв'язувального центра

однак оптимізація процесу в цілому не зводиться до їхнього емпіричного перебирання. Інтенсивно розробляються підходи, які дозволяють визначати загальну стратегію ренатурації, виходячи лише з інформації про структуру та біологічні властивості цільового білка [1, 2].

Особливостями обраного для досліджень білка ScFv-CBD є наявність двох афінних центрів – антигензв'язувального компонента (ScFv's проти rhIFN- 2b) і целюлозозв'язувального домену з целюлозолітичного комплексу *Clostridium thermocellum* (Cellulose Binding Domain, CBD), з'єднаних за допомогою 13-амінокислотного лінкера у певній орієнтації [11]. Роль останнього полягає у просторовому розділенні двох афінних центрів химерного білка для забезпечення їхнього незалежного фолдингу. Раніше нами показано, що при ренатурації ScFv-CBD із тілець включення обмежувальним фактором є відновлення функціональної активності ScFv-компонента [10], оскільки виникає необхідність коректного формування двох дисульфідних зв'язків V-доменів. Зважаючи на це, у даній роботі основну увагу сконцентровано на пошуку оптимальних умов ренатурації саме ScFv-компонента химерного білка.

Велику кількість експериментальних робіт присвячено розробці ефективних підходів до одержання функціонально активних ScFv's ренатурацією з тілець включення. Особливої уваги заслуговує метод ступінчастого рівноважного діалізу [14], заснований на створенні оптимальних умов для форму-

вання елементів вторинної/третинної структури ScFv's у разі встановлення ступінчастого градієнта концентрації ГТХ (рис. 1). Внесенням на окремих етапах ренатурації таких реагентів, як L-аргінін і GSSG, досягається підтримання перехідних станів білкових молекул у розчинному стані і коректне формування дисульфідних містків обох V-доменів [15]. Авторами роботи [15] показано, що утворення дисульфідних зв'язків відбувається на стадії, коли вторинна структура V-доменів вже сформована; крім того, на цій стадії відповідні залишки цистеїну просторово зближені, що сприяє коректному формуванню S-S-містків при внесенні окиснювального реагенту GSSG. Також встановлено етапи ренатурації, на яких внесення L-аргініну ефективно перешкоджає агрегації цільового білка.

Однак метод рівноважного діалізу не є технологічним і потребує значних витрат на реагенти. Для зменшення собівартості процесу нами розроблено метод контрольованого розведення, заснований на застосуванні системи реагентів, і загальної схеми ренатурації, наведеної в оригінальній роботі [14], з деякими модифікаціями. Зокрема, встановлення необхідних концентраційних ступенів денатурувального реагенту (ГТХ) у розчині солюбілізованого ScFv-CBD досягали контрольованим його розведенням буфером для ренатурації В (див. «Матеріали і методи»). В представленій роботі нами досліджено вплив вихідної концентрації білка, а також різне співвідношення реагентів окисно-відновної пари GSSG:GSH, які додавали на різних стадіях

ренатурації, на вихід функціонально активного ScFv-CBD.

Для оцінки успішності ренатурації ScFv-CBD із тілець включення визначали такі її показники, як вихід та ефективність. Вихід денатурованої форми (у відсотках) розраховували за співвідношенням одержаного після ренатурації розчинного ScFv-CBD до його кількості у вихідній формі в тільцях включення. Ефективність ренатурації (у відсотках) розраховували за співвідношенням функціонально активних центрів химерного білка (ScFv і CBD) до загальної їхньої кількості після ренатурації. Зазначений метод базується на виявленні зв'язувальної активності кожного центра за результатами їхньої афінної взаємодії з відповідним лігандом (див. «Матеріали і методи»).

Одним із факторів, який впливає на формування агрегатів при ренатурації, є концентрація цільового білка в розчині. При градієнтному видаленні денатуровального реагенту формуються проміжні стани білкової молекули – розплавлені глобули, які містять експоновані у розчин кластери гідрофобних амінокислотних залишків. Білки в таких станах можуть взаємодіяти між собою, що спричинює формування агрегатів і зниження виходу ренатурації [3]. Відповідно до даних літератури під час ренатурації можуть утворюватися як розчинні, так і нерозчинні білкові агрегати.

Для зниження агрегації білків під час ренатурації розроблено низку підходів. Зокрема, у разі ренатурації ScFv's ступінчастим діалізом показано ефективне запобігання агрегації при введенні до складу діалізного буфера 0,4 М L-аргініну [16]. Однак авторами іншої роботи при застосуванні зазначених умов ренатурації виявлено формування фракції розчинних, але функціонально неактивних форм ScFv's [17]. Одержаний результат можна пояснити утворенням агрегатів і/або продуктів неправильного фолдингу ScFv's. Вирішальну роль у цьому процесі, на нашу думку, відіграє концентрація ScFv's при ренатурації, проте дане припущення потребувало експериментального підтвердження.

Враховуючи вищевикладене, першим завданням було встановити оптимальну вихідну концентрацію солюбілізованого ScFv-CBD, яка б при за-

Таблиця 1

Вплив вихідної концентрації химерного білка на ефективність ренатурації його ScFv-компонента

| № Досліді (див. рис. 2) | Вихідна концентрація ScFv-CBD, мг/мл | Ефективність ренатурації ScFv-компонента, %* ** |
|-------------------------|--------------------------------------|---|
| 1 | 1,06 | 12,7 |
| 2 | 0,79 | 40,0 |
| 3 | 0,53 | 56,9 |
| 4 | 0,40 | 64,3 |
| 5 | 0,26 | 67,0 |

Примітка. У кожному досліді на стадіях ренатурації 2 М 1 М та 1 М 0,5 М ГТХ вносили GSSG (молярне співвідношення GSSG:ScFv-CBD становить 50:1). *Ефективність ренатурації ScFv-компонента розраховували, як описано у розділі «Матеріали і методи»; **для кожного досліді наведено середнє арифметичне показників E_1 , одержаних у трьох незалежних експериментах з ренатурації ScFv-CBD.

стосуванні вищеописаної схеми ренатурації істотно не впливала на формування розчинних агрегатів. Очищений до гомогенного стану ScFv-CBD (>95 %) розводили до необхідної концентрації буфером, який містив 6 М ГТХ. Для дослідження обрано діапазон концентрацій ScFv-CBD від 0,26 до 1,06 мг/мл (табл. 1). Моніторинг ефективності ренатурації ScFv- та CBD-компонентів химерного білка проводили, як описано вище.

Відповідно до результатів, одержаних при розрахунку молярних співвідношень білків у комплексах «ScFv-CBD/rhIFN- 2b», найнижчу ефективність ренатурації ScFv-компонента химерного білка (~12,7 %) спостерігали у разі ренатурації при найвищій його вихідній концентрації (1,06 мг/мл). Подальше зниження вихідної концентрації ScFv-CBD до 0,26 мг/мл сприяло підвищенню вмісту функціонально активних центрів ScFv's після ренатурації до ~67 % (табл. 1).

Антигензв'язувальну активність ScFv-компонента химерного білка, ренатурованого при різних вихідних концентраціях, оцінювали також за допомогою методу ELISA. Для цього одні й ті самі кількості ренатурованого ScFv-CBD в однакових розведеннях наносили в планшети для ELISA і здійснювали імунохімічний аналіз, як описано ви-

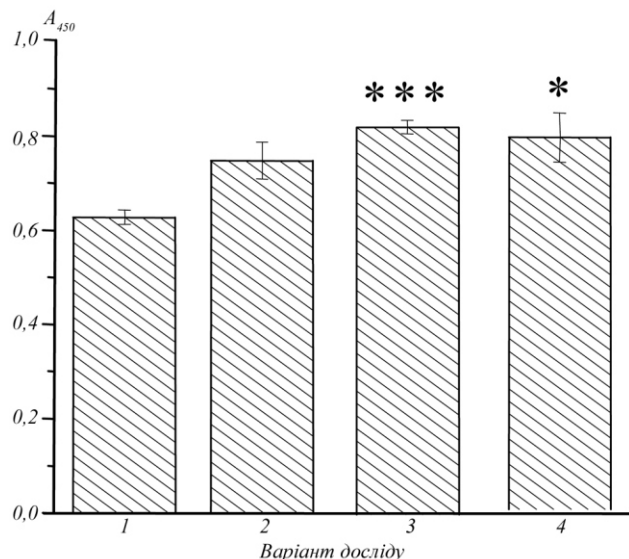


Рис. 2. Аналіз зв'язування ScFv-CBD, ренатурованого при різних вихідних концентраціях, з rhIFN- 2b в ELISA ($M \pm m$; $n = 3$; $*p < 0, 05$). Вихідна концентрація ScFv-CBD при ренатурації становила 1,06 (1); 0,79 (2); 0,53 (3) та 0,4 мг/мл (4) (див. табл. 1). Зв'язувальну активність порівнювали при концентрації ScFv-CBD 0,68 мкг/мл

ще. Наведені на рис. 2 гістограми демонструють, що функціональна активність ScFv-компонента ScFv-CBD, ренатурованого при вихідній концентрації 0,4 мг/мл, вірогідно вища за активність ScFv-CBD, ренатурованого при вихідній концентрації 1,06 мг/мл.

Вміст розчинних агрегатів у фракції ренатурованого при різних вихідних концентраціях ScFv-CBD аналізували методом SEC. У результаті хроматографії отримано три фракції білків, що свідчить про наявність розчинних агрегатів, утворених за рахунок асоціації декількох молекул ScFv-CBD (рис. 3, а, б). Важливо відмітити, що при ренатурації за початкової концентрації ScFv-CBD 0,53 мг/мл вихід його мономерної форми (~46 кДа) був значно вищим, ніж при ренатурації ScFv-CBD у концентрації 1,06 мг/мл. Одержані результати дозволяють стверджувати, що зниження ефективності ренатурації химерного білка відбувається за рахунок формування значної кількості розчинних його агрегатів при концентрації, вищій за 0,53 мг/мл. Встановлення оптимальної концентрації цільових білків є важливим етапом при оптимізації промислових схем їхньої ренатурації, оскільки дозволяє проводити ренатурацію при максимально високих концентраціях білка та зменшувати витрати на реагенти і процедури подальшого концентрування.

Наступне завдання полягало у виявленні оптимальних умов, за яких відбувається коректне формування двох дисульфідних містків ScFv-компонента химерного білка. Для запобігання спонтанному окисненню залишків цистеїну і формуванню міжмолекулярних дисульфідів до проби ScFv-CBD при сольобілізації, хроматографічному очищенні та

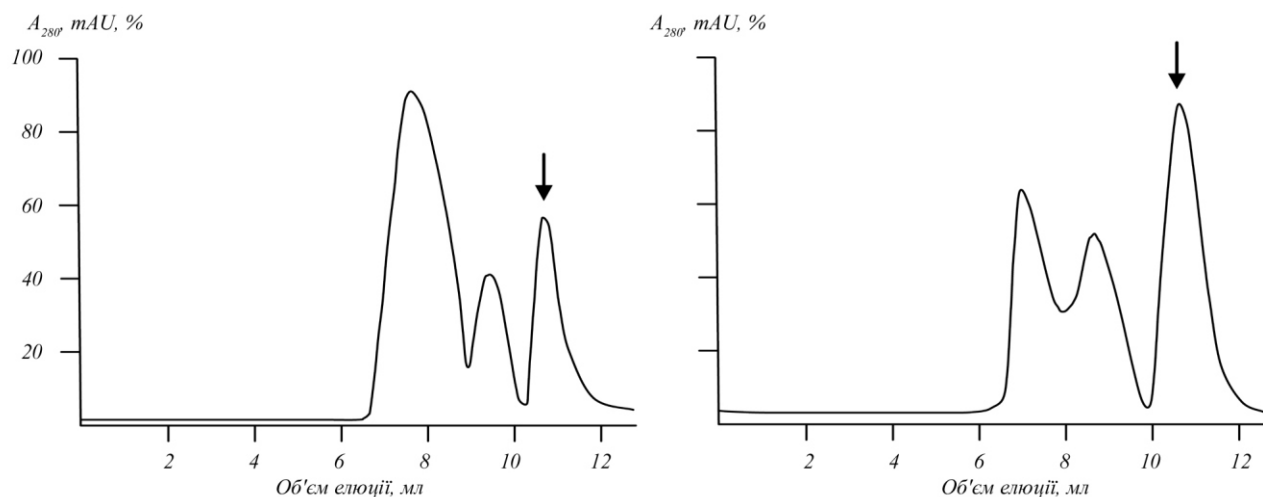


Рис. 3. Аналітична SEC-хроматографія фракцій очищеного ScFv-CBD. Однакову кількість ScFv-CBD, ренатурованого при вихідних концентраціях 1,06 (а) та 0,53 мг/мл (б), наносили на колонку Superdex 75 (10/300) GL і елюювали буфером PBS. Стрілкою позначено пік елюції мономерної форми ScFv-CBD (46 кДа)

Таблиця 2

Вплив співвідношення GSSG:GSH на ефективність ренатурації ScFv- та CBD-компонентів химерного білка

| № Дослід (див. рис. 4) | Молярне співвідношення GSSG:GSH | Стадія ренатурації, на якій вносили GSSG:GSH | Ефективність ренатурації ScFv-компонента, % | Ефективність ренатурації CBD-компонента, % |
|------------------------|---------------------------------|--|---|--|
| 1 | 1:0 | 2 М 1 М ГГХ 1 М 0,5 М ГГХ | 63,3 | 96,1 |
| 2 | 1:1 | 2 М 1 М ГГХ 1 М 0,5 М ГГХ | 49,5 | 96,4 |
| 3 | 1:5 | 2 М 1 М ГГХ 1 М 0,5 М ГГХ | 33,8 | 97,4 |
| 4 | – | – | 20,0 | 98,3 |
| 5 | 1:1 | 2 М 1 М ГГХ | 52,3 | 97,0 |
| 6 | 1:5 | 2 М 1 М ГГХ | 36,9 | 92,0 |

Примітка. Ефективність ренатурації ScFv- та CBD-компонентів (E_1 і E_2 відповідно) розраховували, як описано у розділі «Матеріали і методи». Для кожного дослід наведено середнє арифметичне показників E_1 та E_2 , одержаних у трьох незалежних експериментах з ренатурації ScFv-CBD.

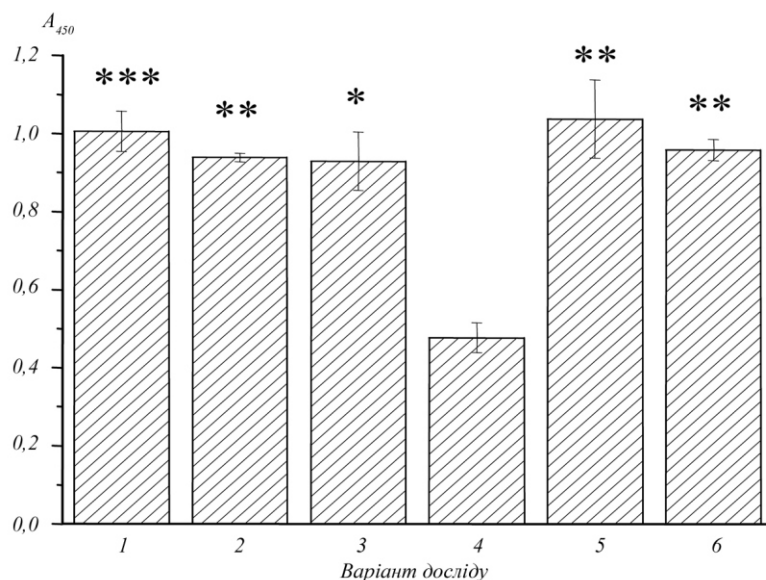


Рис. 4. Аналіз зв'язування ScFv-CBD, ренатурованого за присутності різних співвідношень реагентів пари GSSG:GSH, з rhIFN- 2b в ELISA ($M \pm m$; $n = 3$; * $p < 0, 05$; ** $p < 0, 01$; *** $p < 0,001$). Для варіантів дослідів 1–6 (див. табл. 2) – співвідношення GSSG:GSH, а також стадії ренатурації, на яких вносили зазначені реагенти. Зв'язувальну активність порівнювали при концентрації ScFv-CBD 0,97 мкг/мл

на початковій стадії ренатурації вносили 2-меркаптоетанол до кінцевої концентрації 10 мМ. ScFv-CBD ренатурували при його вихідній концентрації 0,5 мг/мл, визначеній як оптимальна з попередніх експериментів. Формування дисульфідних зв'язків забезпечували додаванням до складу ренатуровального буфера різних співвідношень окисненої та відновленої форм глутатіону на стадіях ренатурації 2 М 1 М та 1 М 0,5 М ГГХ (табл. 2). Діапазон співвідношень реагентів окиснювальної пари обирали відповідно до даних

літератури по ренатурації дисульфідвмісних білків [18].

Одержані результати продемонстрували високу ефективність ренатурації CBD-компонента химерного білка у кожному з експериментів (>90 %), у той час як ефективність ренатурації його ScFv-компонента варіювала в межах від 20 до 63 % (табл. 2). Варто зазначити, що CBD-компонент містить одну неспарену сульфгідрильну групу залишку цистеїну, яка вже на початкових стадіях ренатурації недоступна для взаємодії з SH-групами ScFv-компо-

нента. Це обумовлено унікальною здатністю CBD до формування компактної і функціональної структури при високих концентраціях денатуровального реагенту [19, 20].

Антигензв'язувальну активність ScFv-компонента химерного білка, ренатурованого при різних співвідношеннях глутатіону, оцінювали також методом ELISA. Представлені на рис. 4 гістограми показують, що функціональна активність ScFv-компонента, ренатурованого за відсутності реагентів окисно-відновної пари, вірогідно нижча за його активність у всіх інших варіантах ренатурації. Одержані результати свідчать про можливість ефективної ренатурації ScFv-CBD за відсутності відновленої форми глутатіону, а також про те, що додаткове внесення глутатіону на кінцевій стадії ренатурації (1 М 0,5 М ГГХ) суттєво не впливає на вихід функціонально активного ScFv-компонента.

Висновки. Визначено оптимальні умови ренатурації химерного білка ScFv-CBD із тельць включення *E. coli* із застосуванням розробленого нами методу ступінчастого розведення. Зазначені умови забезпечують високий вихід розчинного ScFv-CBD (> 90 %) та високу функціональну активність його антиген- і целюлозозв'язувального компонентів (відповідно ~63 і ~96 %). Ренатурований ScFv-CBD після іммобілізації на носії може бути використаний як афінний імуносорбент для хроматографічного очищення rhIFN- 2b.

O. B. Gorbatuk, U. S. Nikolayev, D. M. Irodov, I. Ya. Dubey, P. V. Gilchuk

Refolding of ScFv-CBD fusion protein from *Escherichia coli* inclusion bodies

Summary

An inexpensive and effective refolding method for ScFv-CBD fusion protein recovery from E. coli inclusion bodies has been developed. The principle of the proposed method is the stepwise dilution of solubilized ScFv-CBD in the presence of 6 M guanidine hydrochloride with refolding buffer containing L-arginine and glutathione. The influence of initial protein concentration and the molar ratio of oxidized and reduced form of glutathione that was introduced at certain refolding stages has been carefully investigated. It was shown that the decrease in the yield of functional ScFv-CBD and formation of significant amount of soluble aggregates take place when the initial protein concentration is higher than 0.53 mg/ml. The optimal refolding

conditions providing highest yield of soluble monomeric ScFv-CBD as well as the highest functional activity of antigen-binding (ScFv) and cellulose-binding (CBD) moieties (~63 % and ~96 %, respectively) have been found.

Keywords: fusion protein, inclusion bodies, refolding, single-chain antibodies, cellulose-binding domain.

O. B. Gorbatuk, Yu. S. Nikolaev, D. M. Irodov, I. Ya. Dubey, P. V. Gilchuk

Ренатурація химерного білка ScFv-CBD із тельць включення *Escherichia coli*

Резюме

Предложен эффективный и недорогой метод ренатурации химерного белка ScFv-CBD из тельць включения E. coli, основанный на ступенчатом разведении солибулизированного в растворе 6 М гуанидингидрохлорида ScFv-CBD буфером для ренатурации, содержащим L-аргинин и глутатион. Исследовано влияние исходной концентрации белка и разного соотношения реагентов окислительно-восстановительной пары GSSG/GSH, вносимых на определенных стадиях ренатурации, на выход функционально активного ScFv-CBD и его агрегацию. Показано, что снижение выхода активного ScFv-CBD происходит из-за формирования значительного количества его растворимых агрегатов при исходной концентрации выше 0,53 мг/мл. Определены условия ренатурации, обеспечивающие наибольший выход растворимого ScFv-CBD в мономерной форме, а также наивысшую активность его антигенсвязывающего (ScFv) и целлюлозосвязывающего (CBD) компонентов (соответственно ~63 и ~96 %).

Ключевые слова: химерный белок, тельца включения, ренатурация, одноцепочечные антитела, целлюлозосвязывающий домен.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Vallejo L. F., Rinas U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins // *Microb. Cell Fact.*—2004.—**3**, N 1.—P. 11–.
2. Tsumoto K., Ejima D., Kumagai I., Arakawa T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies // *Protein Exp. Purif.*—2003.—**28**, N 1.—P. 1–8.
3. Гильчук П. В. Оценка методов ренатурации для промышленного получения рекомбинантных белков из тельць включення *Escherichia coli* в биологически активной форме // *Біополімери і клітина.*—2004.—**20**, № 3.—С. 182–192.
4. Moroney S., Pluckhun A. Modern antibody technology: The impact on drug development // *Modern Biopharmaceuticals / Ed. J. Knablein.*—Weinheim: Wiley-VCH, 2005.—Vol. 4.—P. 1147–1186.
5. Blazek D., Celer V. The production and application of single-chain antibody fragments // *Folia Microbiol.*—2003.—**48**, N 5.—P. 687–698.
6. Skerra A., Pluckhun A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli* // *Science.*—1988.—**240**, N 4855.—P. 1038–1041.
7. Glockshuber R., Schmidt T., Pluckhun A. The disulfide bonds in antibody variable domains: effects on stability, folding *in vitro*, and functional expression in *Escherichia coli* // *Biochemistry.*—1992.—**31**, N 5.—P. 1270–1279.

8. Skerra A., Pluckthun A. Secretion and *in vivo* folding of the Fab fragment of the antibody McPC603 in *Escherichia coli*: influence of disulphides and *cis*-prolines // Protein Eng.–1991.–**4**, N 8.–P. 971–979.
9. Ge L., Knappik A., Pack P., Freund C., Pluckthun A. Expression antibodies in *Escherichia coli* // Antibody Engineering / Ed. C. A. Borrebaeck.–Oxford: Univ. press, 1995.– P. 229–266.
10. Гільчук П. В. Розробка технології одержання одноланцюгових антитіл в *Escherichia coli*: Дис. ... канд. біол. наук / Ін-т молекуляр. біології і генетики НАН України.–К., 2006.–134 с.
11. Гільчук П. В., Окунєв О. В., Павлова М. В., Іродов Д. М., Горбатюк О. Б. Одержання злитого білка ScFv-CBD і його застосування для афінного очищення рекомбінантного інтерферону 2b людини // Укр. біохім. журн.–2006.–**78**, № 2.–С. 18–27.
12. Gilchuk P. V., Volkov G. L. Immobilization of mouse single chain antibodies for affinity chromatography using cellulose-binding protein // Укр. біохім. журн.–2006.–**78**, № 4.–С. 156–159.
13. Westermeier R. Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations.–Weinheim: VCH, 1997.–331 p.
14. Tsumoto K., Shinoki K., Kondo H., Uchikawa M., Juji T., Kumagai I. Highly efficient recovery of functional single-chain Fv fragments from inclusion bodies overexpressed in *Escherichia coli* by controlled introduction of oxidizing reagent – application to a human single-chain Fv fragment // J. Immunol. Meth.–1998.–**219**, N 1–2.–P. 119–129.
15. Umetsu M., Tsumoto K., Hara M., Ashish K., Goda S., Adschiri T., Kumagai I. How additives influence the refolding of immunoglobulin-folded proteins in a stepwise dialysis system: Spectroscopic evidence for highly efficient refolding of single-chain Fv-fragment // J. Biol. Chem.–2003.–**278**, N 11.–P. 8979–8987.
16. Tsumoto K., Umetsu M., Kumagai I., Ejima D., Philo J.S., Arakawa T. Role of arginine in protein refolding, solubilization and purification // Biotechnol. Progr.–2004.–**20**, N 5.–P. 1301–1308.
17. Sinacola J. R., Robinson A. S. Rapid refolding and polishing of single-chain antibodies from *Escherichia coli* inclusion bodies // Protein Exp. Purif.–2002.–**26**, N 2.–P. 301–308.
18. Raina S., Missiakas D. Making and breaking disulphide bonds // Annu. Rev. Microbiol.–1997.–**51**.–P. 179–202.
19. 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.
20. Berdichevsky Y., Lamed R., Frenkel D., Gophana U., Bayer E. A., Yaron S., Shoham Y., Benhar I. Matrix-assisted refolding of single-chain Fv-cellulose binding domain fusion protein // Protein Exp. Purif.–1999.–**17**, N 2.–P. 249–259.

УДК 579.69 + 577.112
Надійшла до редакції 19.06.07