ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини”
Національної академії медичних наук України

Біфункціональні злиті білки для афінної хроматографії та імунодіагностики

Автор:
ГОРБАТЮК Оксана Борисівна – кандидатка біологічних наук, старший дослідник, зівідувачка лабораторії генно-інженерних біотехнологій ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини Національної академії медичних наук України".

Київ - 2022

Мета роботи: оптимізація методів одержання розчинних, біологічно активних рекомбінантних білків, відмінних за своїми структурно-функціональними властивостями, в *E. coli* та їх практичне застосування

ОБ’ЄКТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

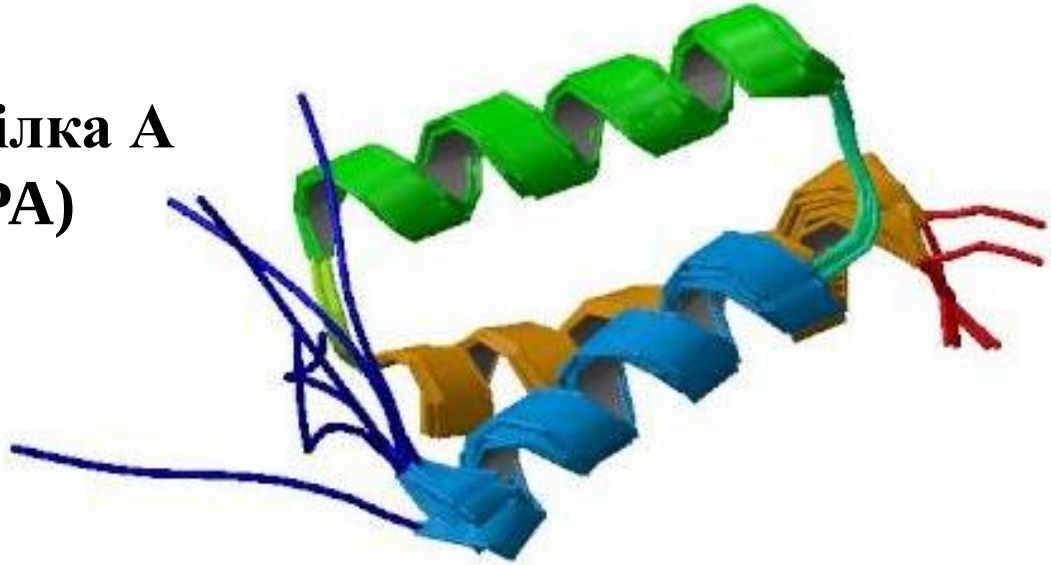
SPA-CBD, **SPA-Cys**	біоліганди, на основі білка А *Staphylococcus aureus* (SPA) для хроматографічного очищення імуноглобулінів класу G (IgG) людини та тварин та для створення біосенсорів

SPA-BAPmut	генно-інженерний імунокон’югат SPA та бактеріальної лужної фосфатази (BAP – bacterial alkaline phosphatase) з покращеними каталітичними властивостями, що є універсальним вторинним імунореагентом.

ЗАВДАННЯ 1

Визначити можливість продукції рекомбінантних злитих білків SPA-CBD, SPA-CBD_2, SPA-Cys та SPA-BAPmut у розчинній формі синтезом в *E. coli*

Структура та властивості білка А *Staphylococcus aureus* (SPA)

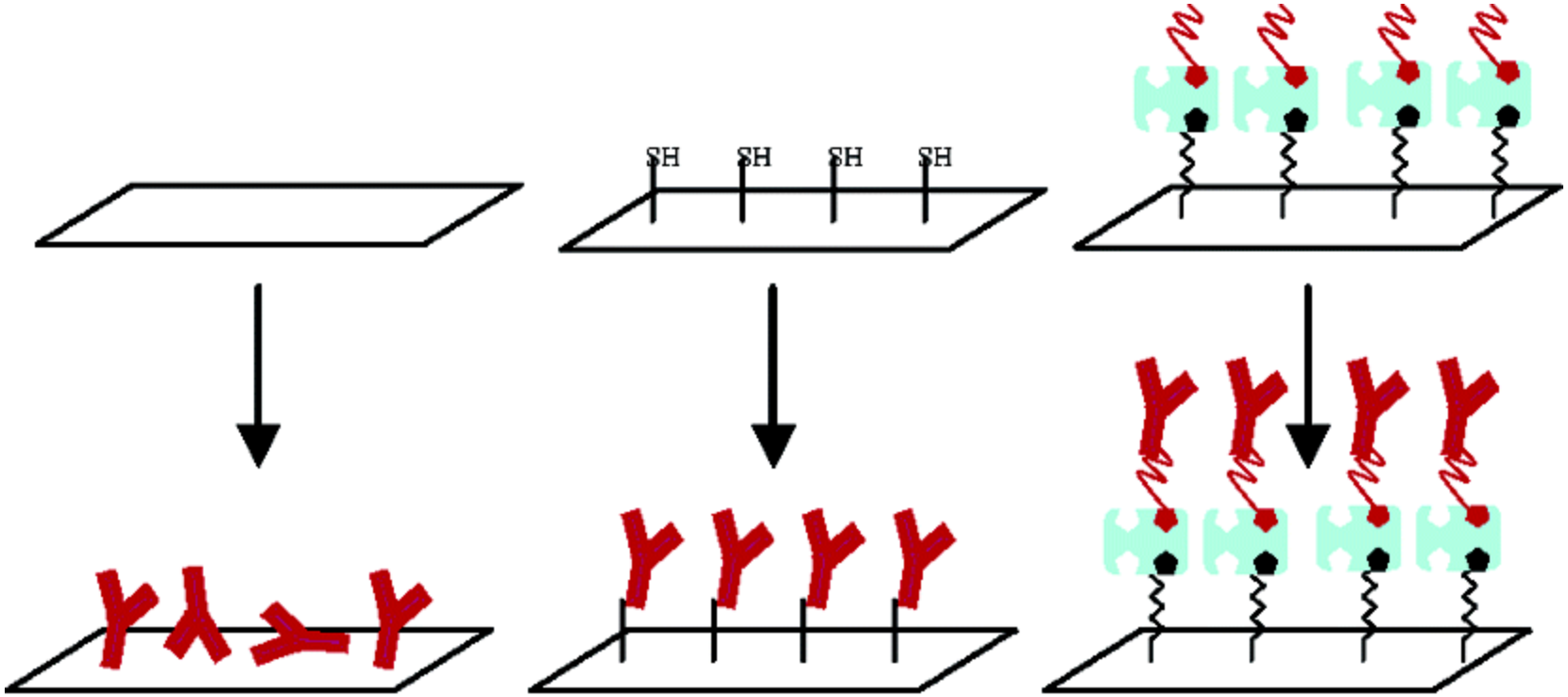


Переваги SPA:

•висока конформаційна стабільність та стійкість до дії фізико-хімічних факторів;
•стійкість до дії протеаз;
•стабільність в діапазоні pH (2,0 – 11,0);
•можливість ренатурації після обробки денатуруючими розчинами сечовини та гуанідингідрохлориду;
•відсутність цистеїнових залишків спрощує процес очищення та ренатурації SPA.

	Білок А (SPA)
Вид продуцента	***Staphylococcus aureus***
Імуноглобулінзв'язуючі домени	**5 (E, D, A, B, C) 42 кДа**
Структура доменів	**3 α-спіралі**
Зв'язування з: CH2-CH3	**+**
Зв'язування з: CH1	**-**
Зв'язування з: VH(VH3 родина)	**+**

Стратегії іммобілізації білків на матрицях



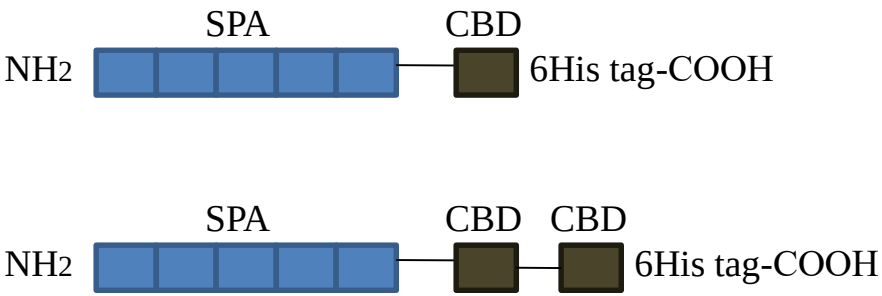
Непряма (стохастична) іммобілізація

Пряма (орієнтована) іммобілізація

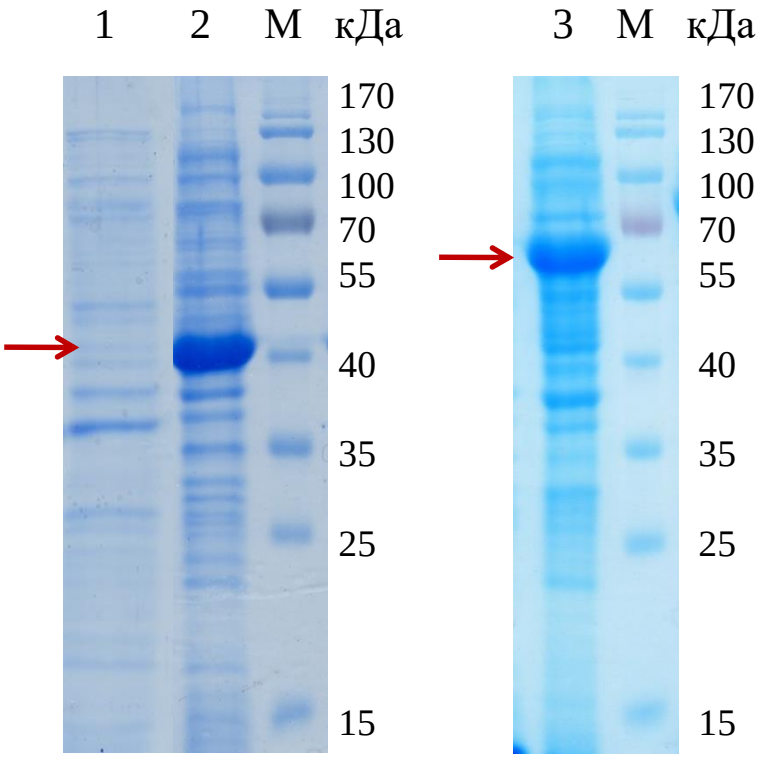
Іммобілізація на хімічно активованих матрицях

Іммобілізація за рахунок біоафінної взаємодії білка-партнера

Синтез злитих рекомбінантних білків SPA-CBD, SPA-CBD2 в *E. coli*



Схематичне зображення рекомбінантних білків SPA-CBD, SPA-CBD2



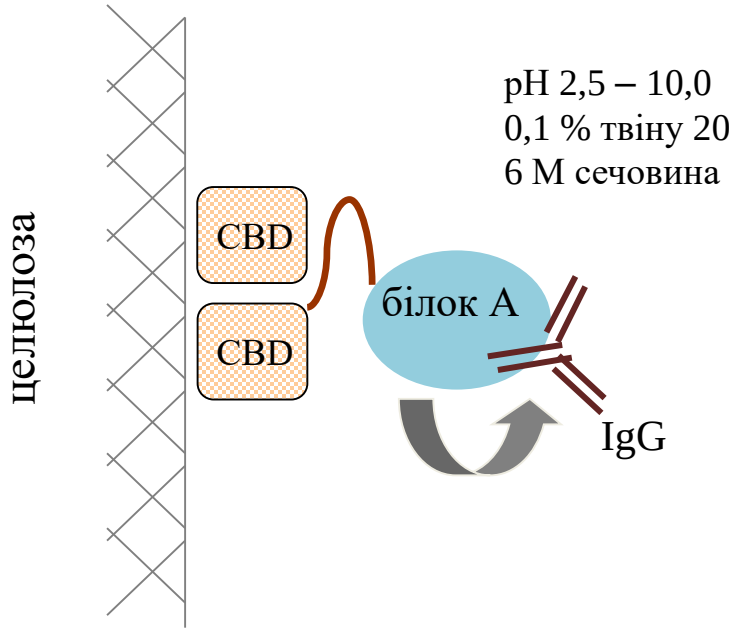
Назва білка	Вихід, г/л культури *E.coli*
SPA-CBD	**0,72**
SPA-CBD2	**0,53**

Електрофореграма лізатів клітин *E. coli* BL21(DE3) в яких індукували синтез SPA-CBD (2), SPA-CBD_2 (3)
1 – сумарний лізат клітин продуцента без індукування експресії;
M – маркери молекулярної маси

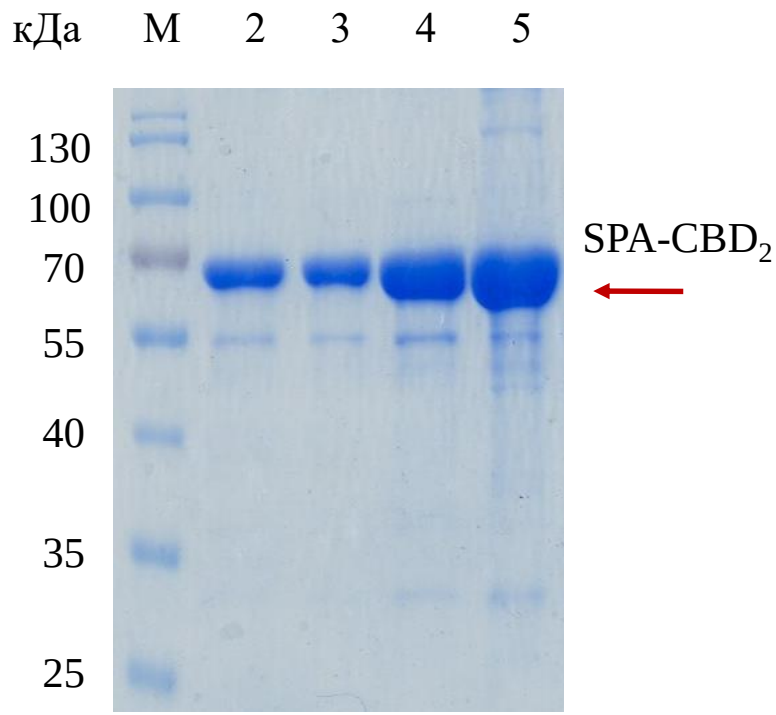
ЗАВДАННЯ 2

Розробити підходи до створення афінних сорбентів для хроматографічного очищення IgG тварин та людини на основі біоафінно іммобілізованих SPA-CBD, SPA-CBD_2 на полісахаридних матрицях і ковалентно іммобілізованого SPA-Cys на хімічно активованих носіях.

Створення хроматографічного сорбента на основі біоафінно іммобілізованого SPA



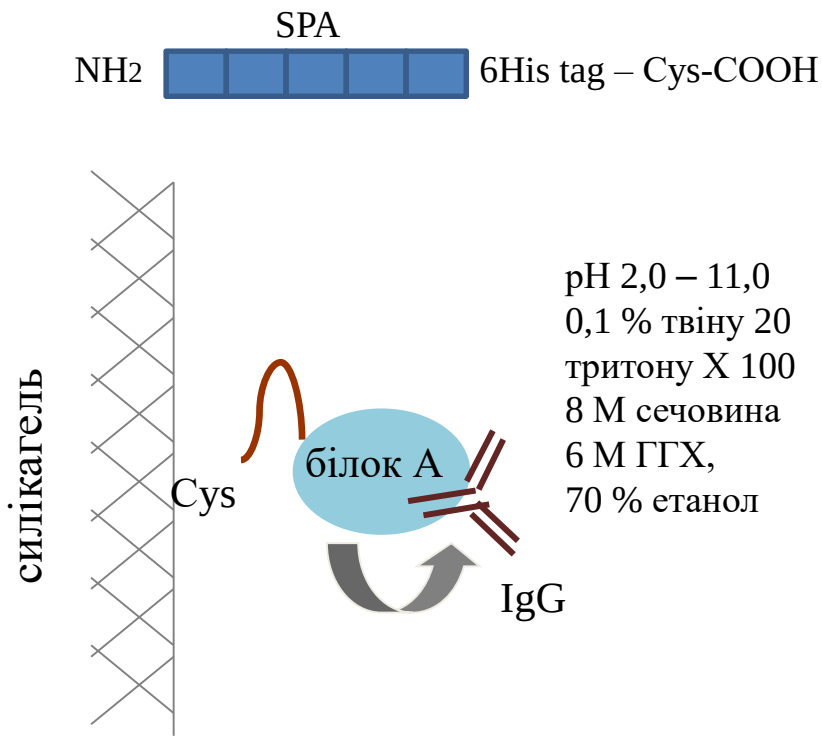
Схематична зображення афінного сорбента на основі іммобілізованого SPA-CBD2



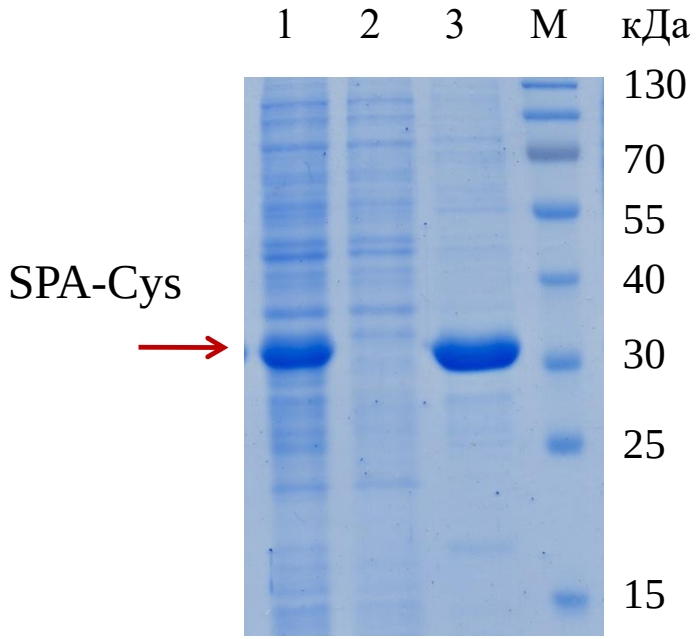
Електрофреграма SPA-CBD$_2$ зв'язаного з полісахаридними матрицями:

M - маркери молекулярної маси;
2 – фібрилярна целюлоза CF I;
3 - фібрилярна целюлоза CF II;
4 – мікрокристалічна целюлоза CC31;
5 – хітин

Створення хроматографічного сорбента на основі ковалентно іммобілізованого SPA



Схематичне зображення афіного сорбенту на основі іммобілізованого SPA - Cys

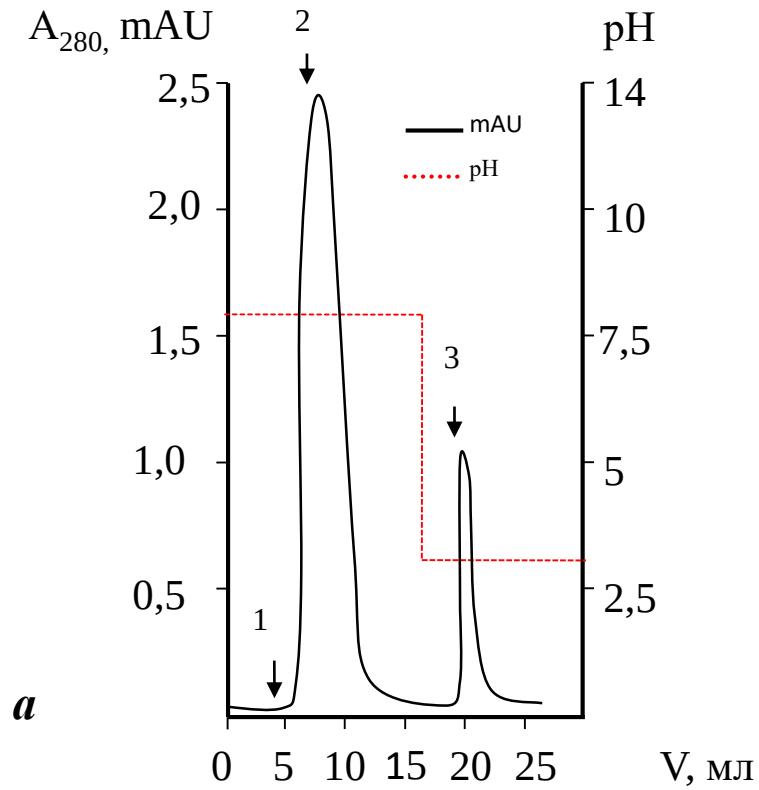


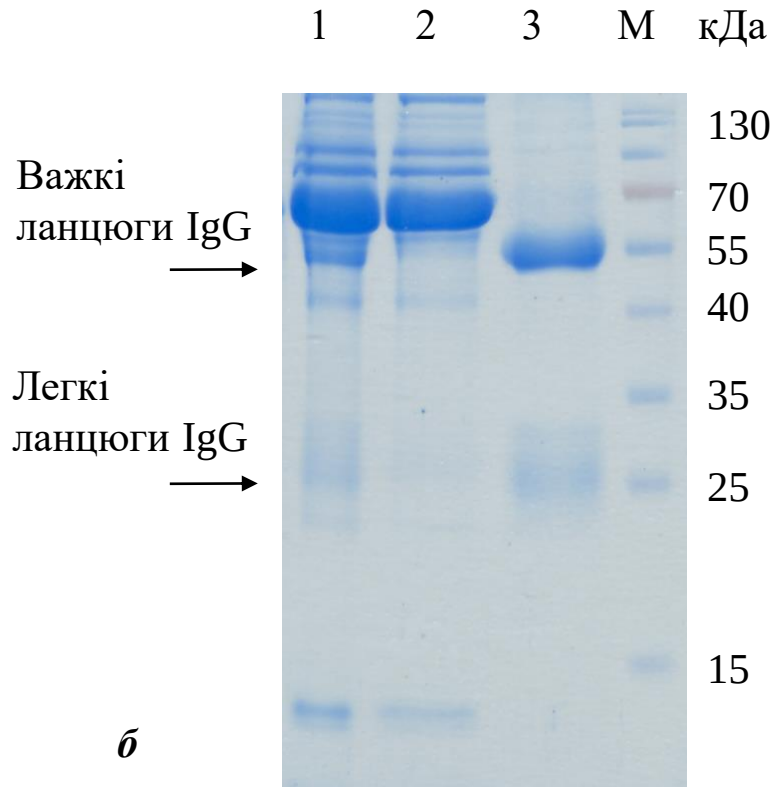
Електрофореграма білкових фракцій отриманих при очищенні SPA-Cys :

1 – фракція розчинних білків клітин, яку наносили на сорбент;
2 – білки, які видаляються при промиванні сорбенту;
3 – очищенний SPA-Cys;
M – маркери молекулярної маси

Рівень накопичення SPA-Cys становив 0,98 г / л культури E. coli

Очищення IgG на сорбенті з іммобілізованим SPA





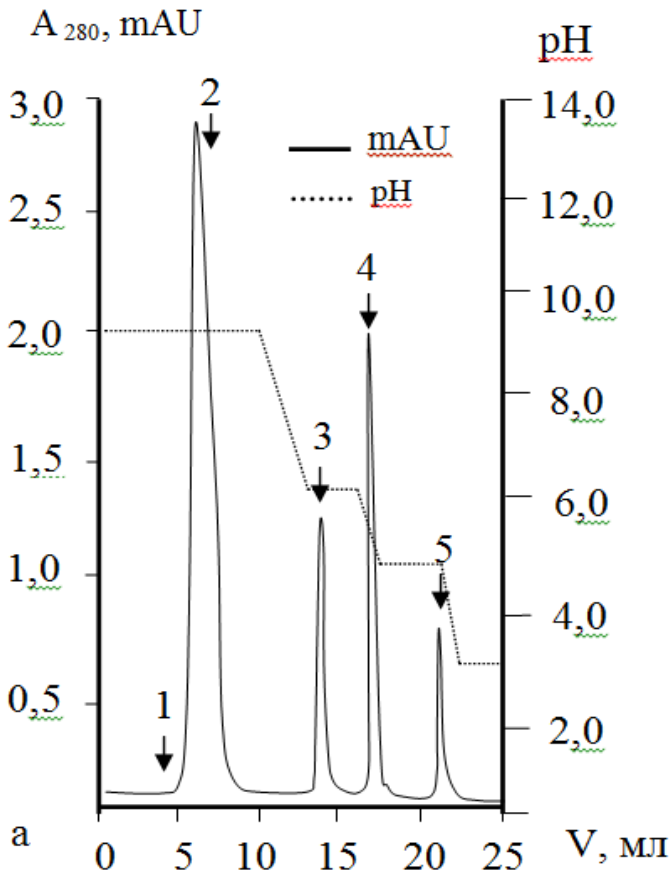
***а* – хроматограма**

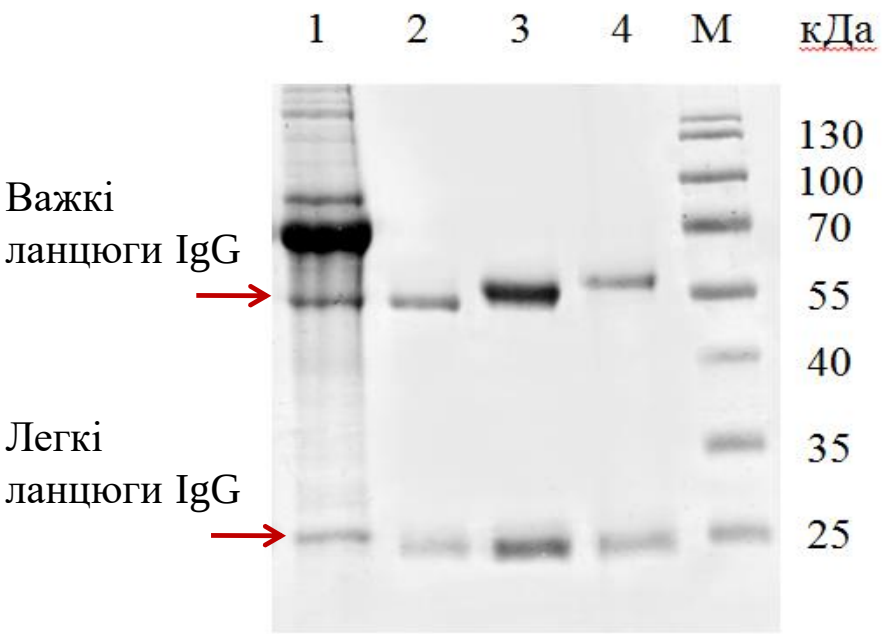
1 – нанесення білків сироваток крові мишей;
2 - білки, які видаляються при промиванні сорбента
3 – елюція очищених IgG

***б* – електрофореграма фракцій білків**

1 – білки сироваток крові, які наносили на сорбент;
2 - білки, які не зв'язалися з сорбентом;
3 - очищена фракція IgG;
4- маркери молекулярної маси

Фракціонування підкласів IgG миші на сорбенті з іммобілізованим SPA





б

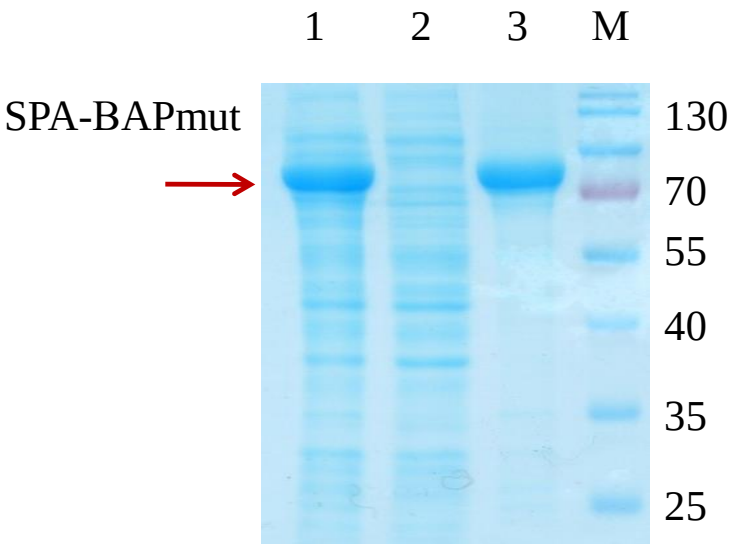
а - хроматограма (1 – нанесення білків сироватки крові; 2 - білки, які видаляються при промиванні сорбента; 3-5 – елюція зв'язаних антитіл 0,1 М Na-фосфатним буфером, pH 6,0; 0,1 М Na-цитратним буфером, pH 4,5; 0,1 М Na-цитратним буфером, pH 3,5, відповідно.

б – електрофореграма фракцій білків (1 – сироватки крові, які наносили на колонку; 2-4 – очищені фракції IgG, отримані в результаті градиєнтної елюції; 5 – маркери молекулярної маси

ЗАВДАННЯ 3

Показати можливість застосування генно-інженерного імунокон’югата SPA-BAPmut як універсального вторинного імунореагента для імунохімічних тестів

Очищення злитого білка SPA-BAPmut



Електрофореграма білкових фракцій отрима-них при очищенні SPA-BAPmut: 1 – фракція розчинних білків клітин, яку наносили на сорбент; 2 – білки, які видаляються при промиванні сорбенту; 3 – очищений SPA-BAPmut, M – маркери молекулярної маси

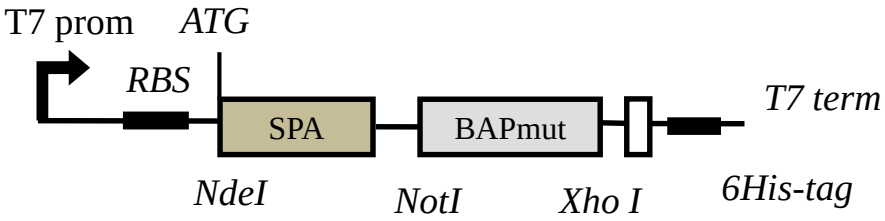
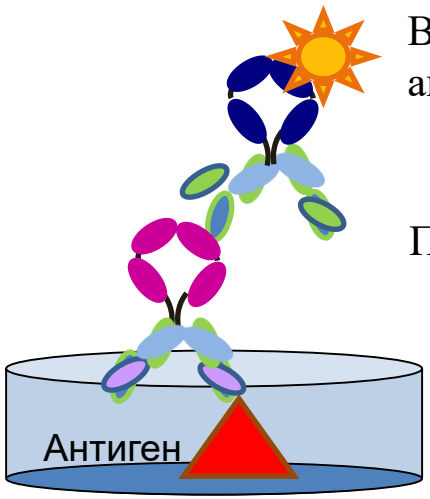


Схема розташування елементів експресувальної касети SPA-BAPmut у векторі *pET-24a(+)*

Фракція	Об'єм, мл	Загальна кількість білка, мг	Функціональна активність, BAPmut, %
Розчинних білків цитоплазми	10	6	100
Після очищення на Ni-NTA сефарозі	5,7	5,6	не визначали
Після заміни буфера для елюції на буфер для BAPmut	5,0	5,0	87

Рівень накопичення SPA-BAPmut становив 0,82 г / л культури E. coli

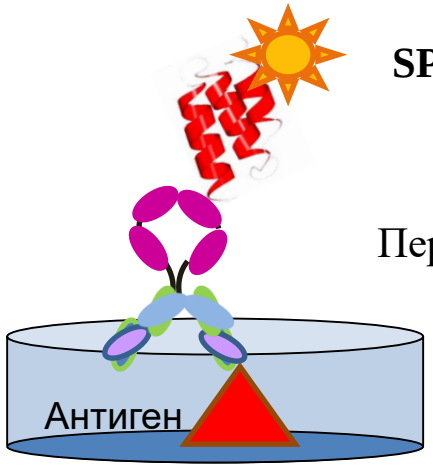
Схема проведення імуноферментного аналізу



Вторинні антивидові антитіла

Первинні антитіла

В кожному окремому випадку використовують специфічні антивидові вторинні антитіла



SPA-BAPmut

Первині антитіла

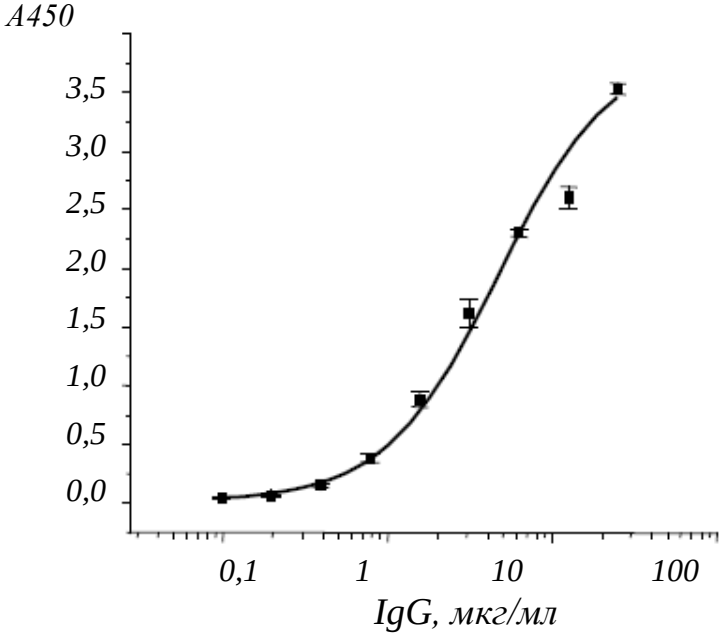
Як універсальний вторинний імунореагент використовують SPA-BAPmut

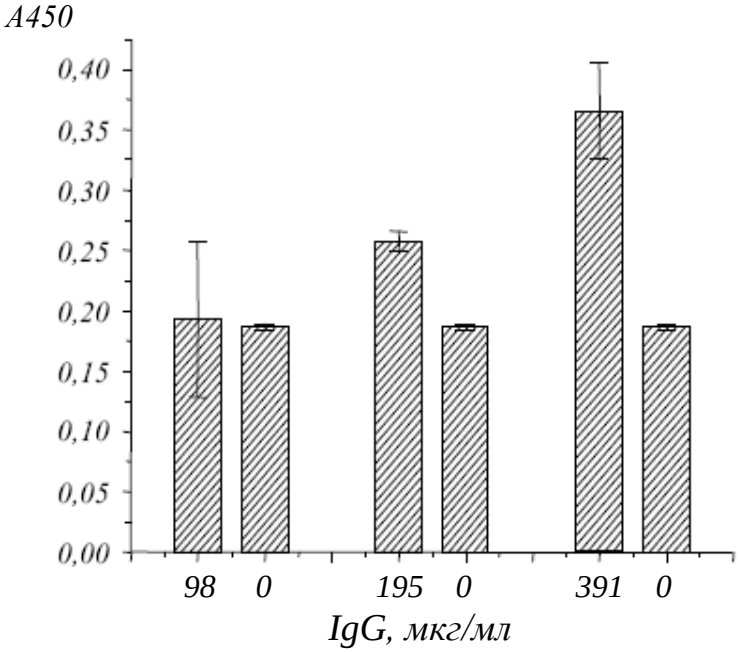
Афінність SPA до різних підкласів IgG

Вид	Підклас антитіл	SPA
Людина	IgG1,IgG2 IgG3 IgG4 IgM IgD IgA, Fab, ScFv	+++ + +++ + - +
Миша	IgG1 IgG2a, IgG2b IgG2c IgM	+ +++ +++ -
Щур	пул антитіл	+
Вівця	пул антитіл	+
Кроль	пул антитіл	+++
Мурчак	пул антитіл	+++

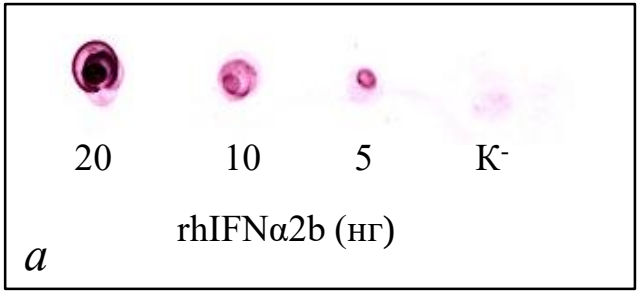
+++ висока спорідненість
++ середня спорідненість
+ слабка спорідненість
- немає спорідненості

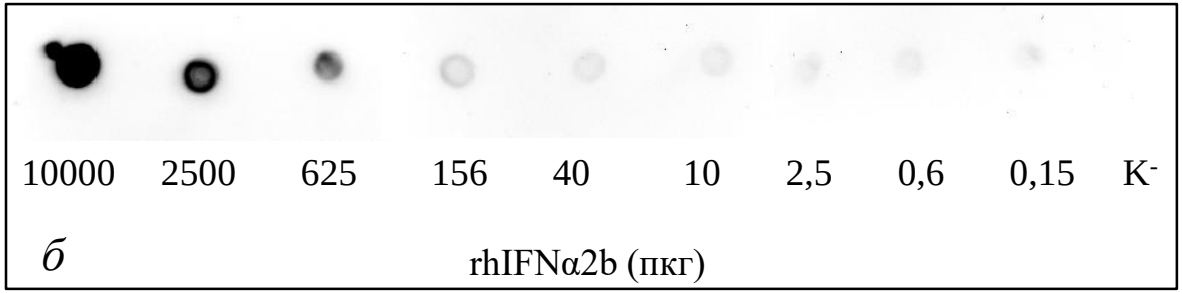
Використання SPA-BAPmut як вторинного імунореагенту





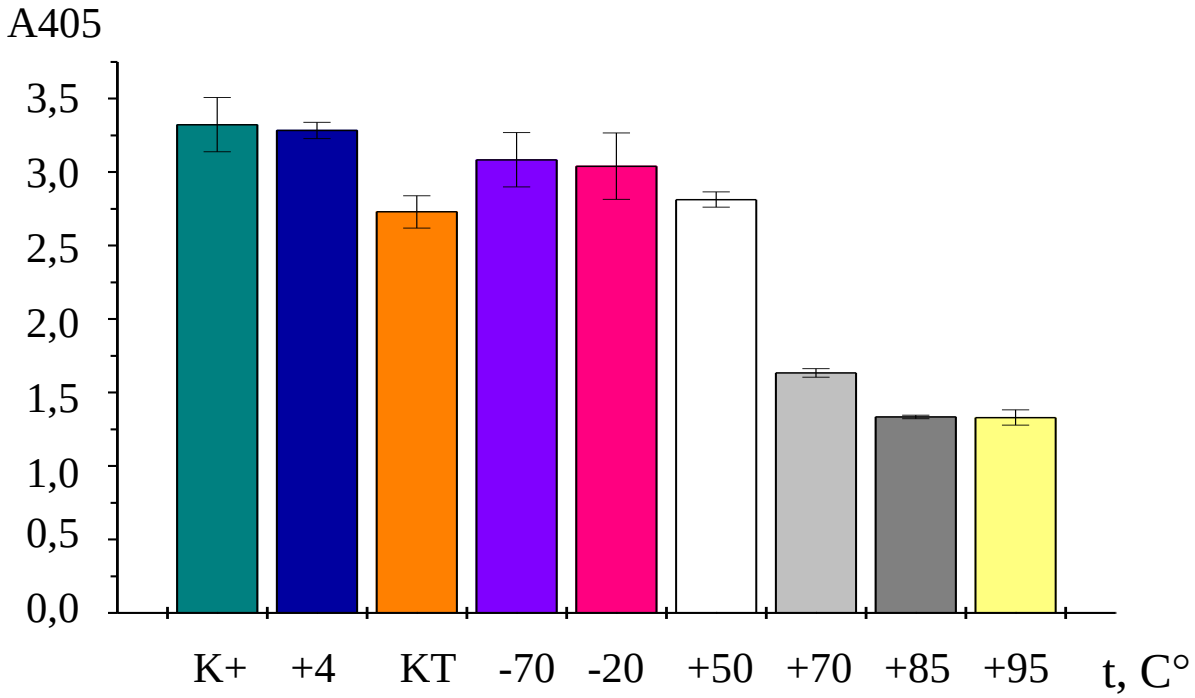
Визначення мінімальної концентрації IgG, яка детектується за використання SPA-BAPmut в ELISA





Визначення концентрації антигену (rhIFNα2b), яка детектується SPA-BAPmut в дот-блоті з використанням колориметричного (а) та хемілюмінесцентного (б) субстратів

Вплив різних температур на біфункціональну активність SPA-BAPmut



Залишкова активність SPA-BAPmut після обробки:

+4 C° - 99%
KT - 83%
-70 C°- 92,7%
-20 C°- 91%
+50 C°- 84,7%
+70 C°- 49%
+85 C° - 40,2 %
+95 C° - 40%

Умови зберігання SPA-BAPmut:

1) Кімнатна температура (КТ); +4, - 70, -20 C° - доба
2) При температурі, +50, +70, +85, +95 C° - 10 хв

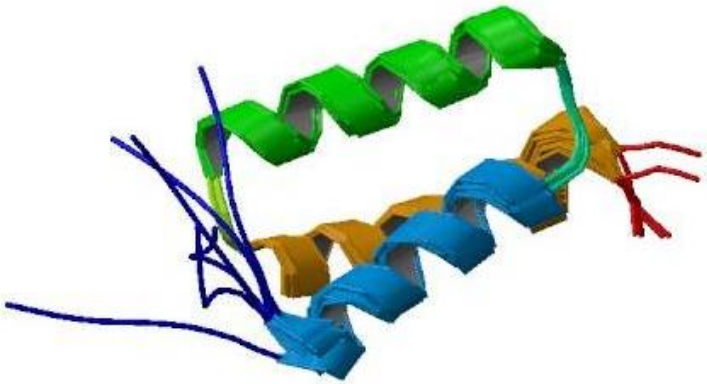
K+ - SPA-BAPmut отриманий безпосередньо перед проведенням експерименту.

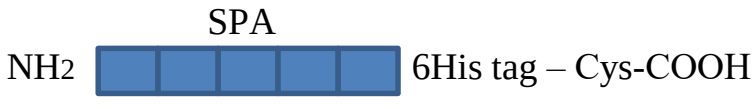
ЗАВДАННЯ 4

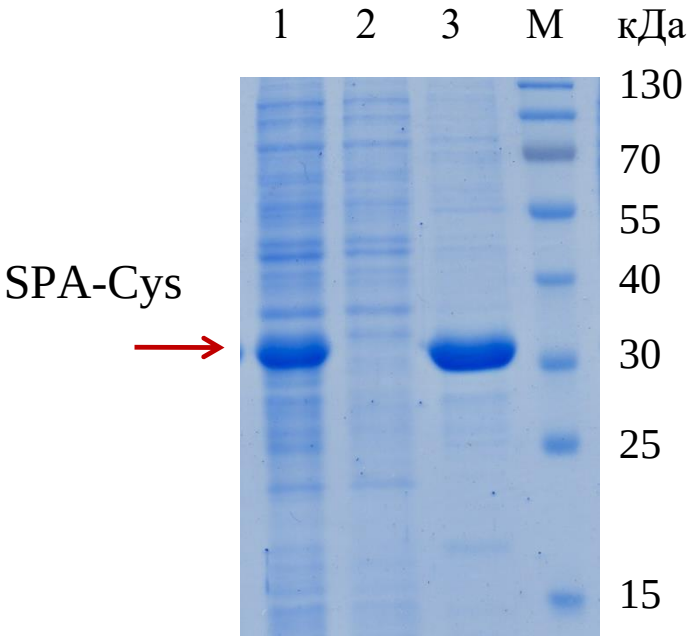
Показати можливість застосування SPA-Cys як біоселективного елемента імуносенсора

Переваги застосування SPA створення біосенсора

•висока конформаційна стабільність та стійкість до дії фізико-хімічних факторів, pH (2,0 – 11,0);
•стійкість до дії протеаз;
•високий рівень накопичення у функціонально-активній формі бактерійним синтезом
•взаємодіє з імуноглобулінами багатьох видів тварин та людини,
•відсутність цистеїнових залишків, що забезпечує сайт-специфічну іммобілізацію SPA-Cys на поверхні біосенсора



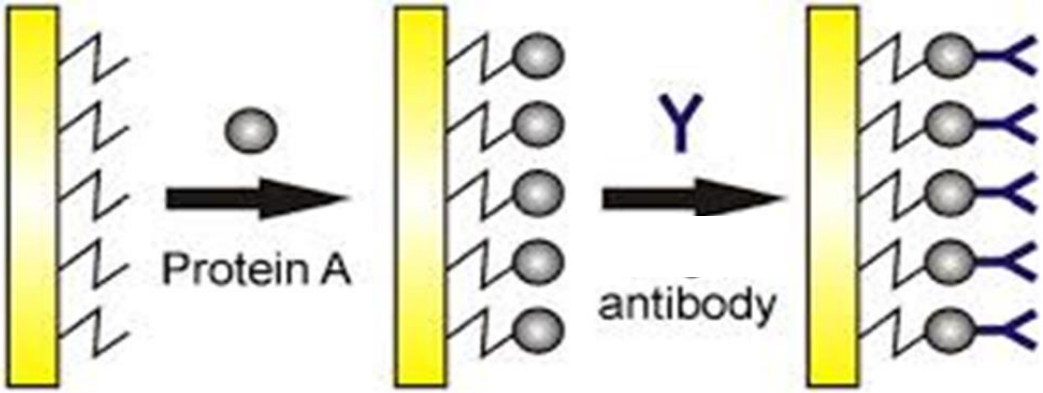




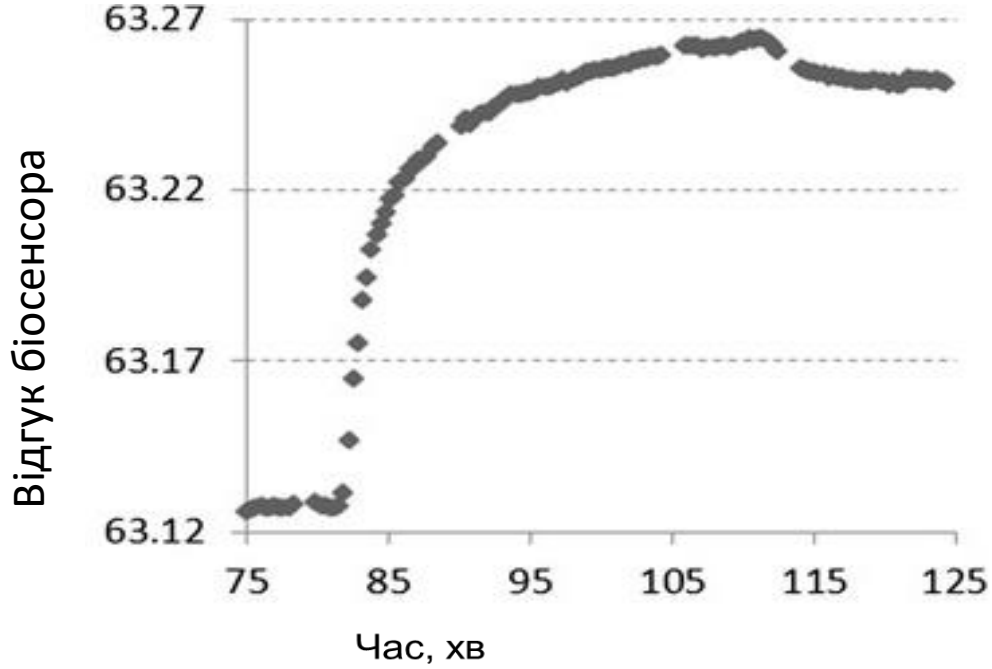
Електрофореграма білкових фракцій отриманих при очищенні SPA-Cys :

1 – фракція розчинних білків клітин, яку наносили на сорбент;
2 – білки, які видаляються при промиванні сорбенту;
3 – очищенний SPA-Cys;
M – маркери молекулярної маси

Застосування SPA-Cys як біоселективного елемента імуносенсора

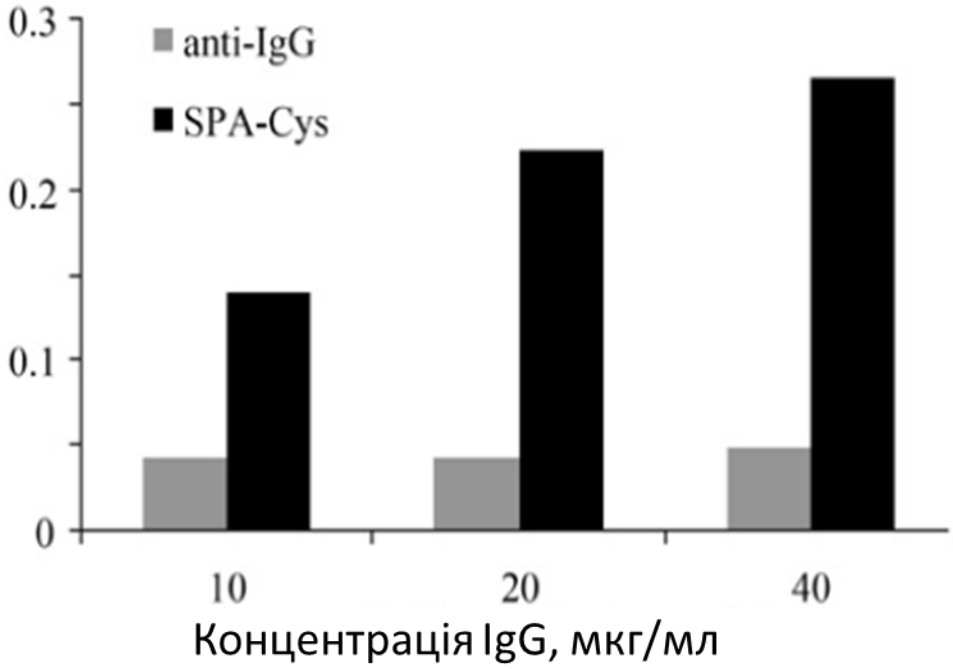


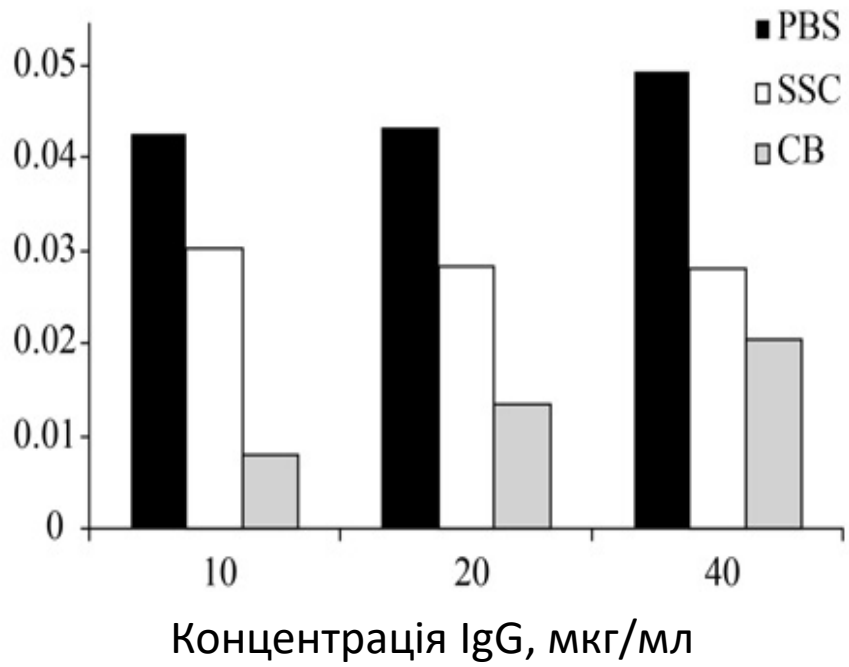
Схематичне зображення імуносенсора на основі SPA-Cys, ммобілізовного на золотій сенсорній поверхні ППР спекрометра «Plasmon-4m»



ППР сенсограма, що демонструє іммобілізацію біоселективного елемента на основі 1 µM SPA-Cys, на золотій сенсорній поверхні ППР спекрометра «Plasmon-4m»

Характеристика біоселективного елемента імуносенсора на основі SPA-Cys

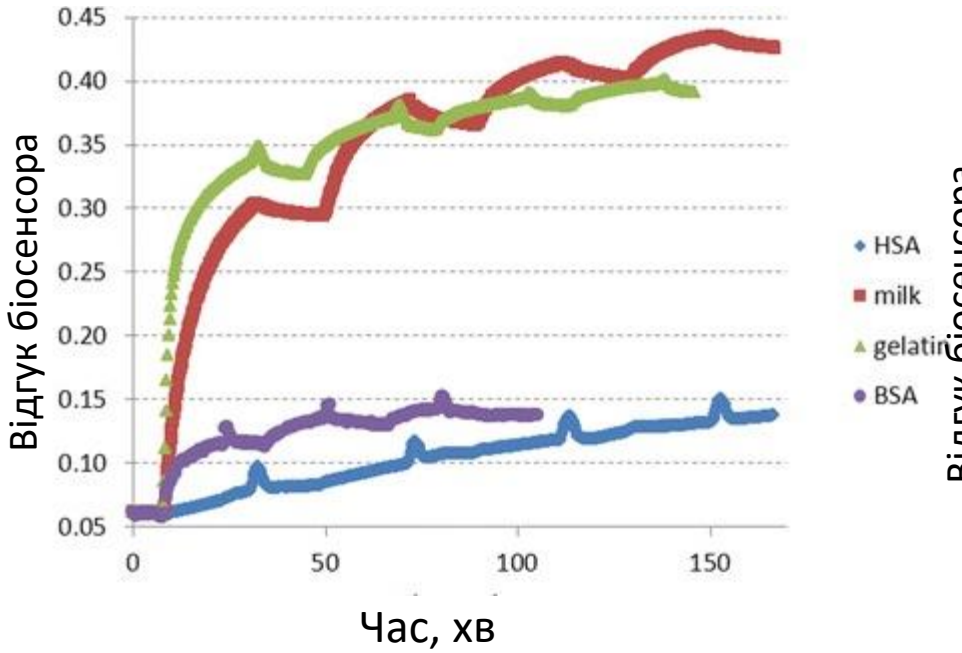


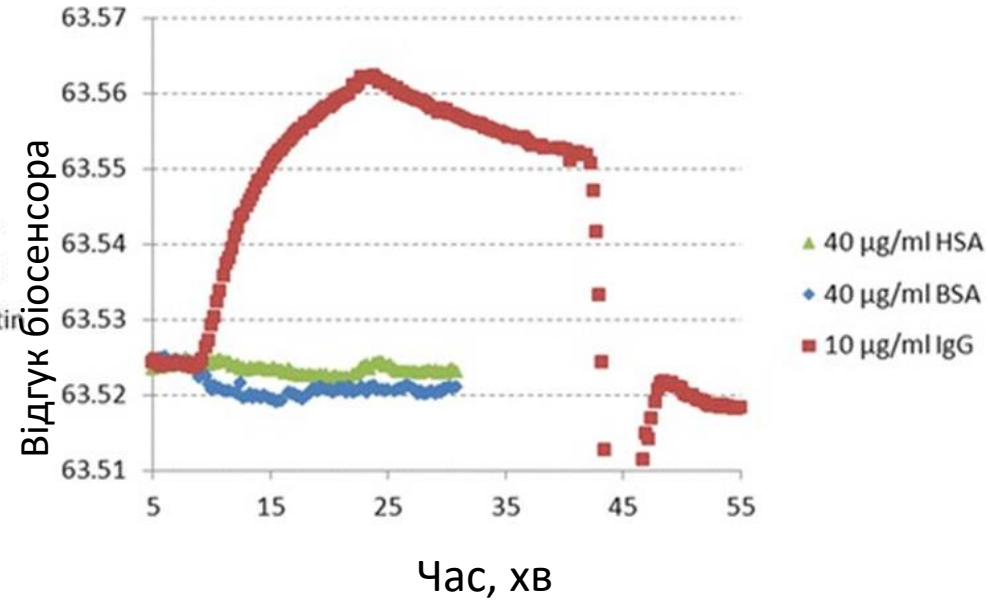


Порівняльна гістограма показників відгуків ППР сенсора після взаємодії біоселективного елементу на основі SPA-Cys та анти-IgG кози із IgG у концентрації 10, 20 та 40 µg/ml

Гістограма результатів визначення оптимального складу робочого буферного розчину для іммобілізації IgG.

Характеристика біоселективного елемента імуносенсора на основі SPA-Cys

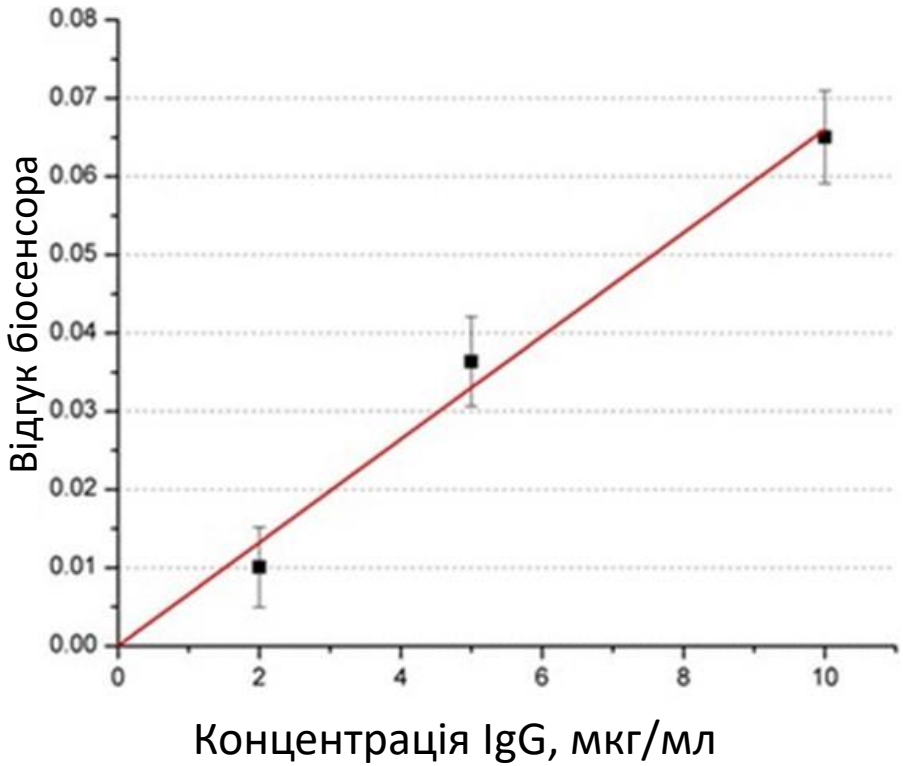


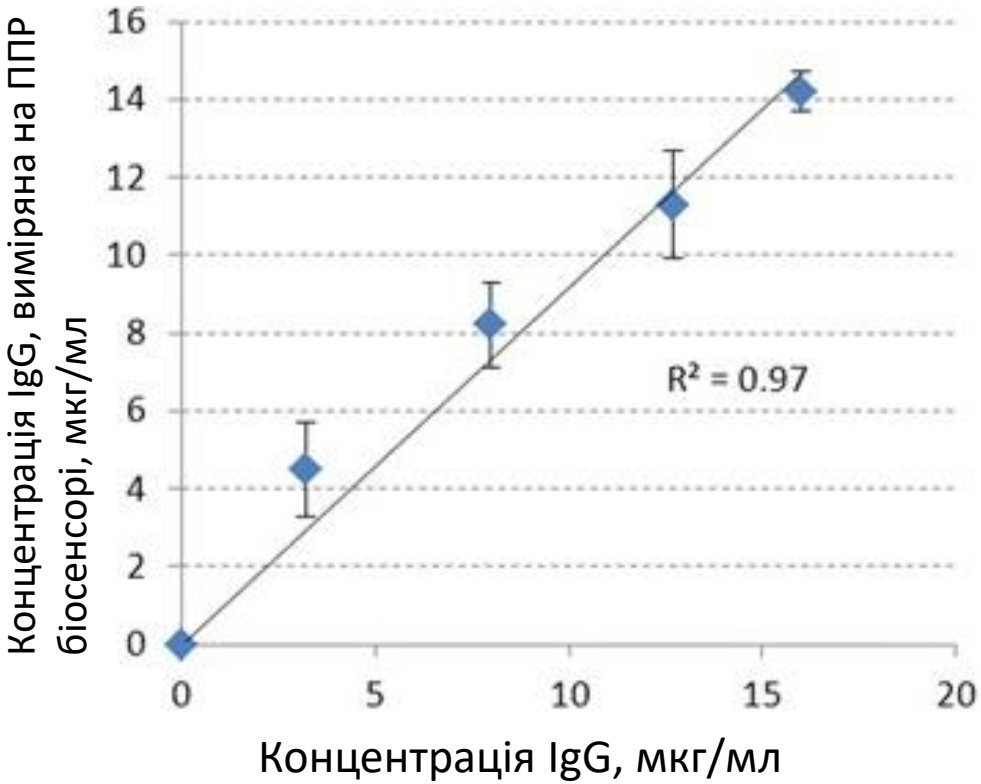


ППР сенсограма, що демонструє процес іммобілізації блокуючого агента на золотій сенсорній поверхні: HSA (блакитний), BSA (фіолетовий), желатин (зелений), білки молока (червоний)

Порівняльна гістограма показників відгуків SPR сенсора після взаємодії біоселективного SPA-Cys із 10 мг/мл IgG (червоний), 40 мг/мл HSA (зелений), та 40 µg/ml BSA (блакитний)

Характеристика біоселективного елемента імуносенсора на основі SPA-Cys





Залежність відгуку біосенсора від концентрації IgG

Кореляція між концентрацією IgG, що вимірюється за допомогою ППР біосенсора на основі SPA-Cys та реальною концентрацією gG

ВИСНОВКИ

1. Сконструйовано рекомбінантні білки SPA-CBD, SPA-CBD_2, SPA-Cys, SPA-BAPmut та штами-продуценти для їх отримання в розчинній формі експресією в *E. coli*. Вихід SPA-CBD становив 500 мг/л, SPA-CBD_2 – 720 мг/л, SPA-Cys – 980 мг/л, SPA-BAPmut – 860 мг/л культури *E. coli*.
2. Показано ефективність використання іммобілізованих SPA-CBD, SPA-CBD_2 на целюлозі та SPA-Cys на силікагелі як афінних сорбентів для хроматографічного очищення полі- та моноклональних антитіл тварин і людини з високим ступенем чистоти (>95 %), а також для фракціонування на підкласи IgG миші. Введення додаткового CBD забезпечило більш афінну іммобілізацію SPA на полісахаридній матриці.
3. Визначено можливість використання SPA-BAPmut як універсального вторинного імунореагента, що дозволяє детектувати менше 0,2 нг антигену.
4. Показано можливість застосування SPA-Cys, після його іммобілізації на золотій поверхні вимірювальної комірки спектрометра ППР, як проміжного компонента для створення імуносенсора.
5. Бактерійний синтез SPA-Cys є продуктивнішим і дешевшим, ніж отримання антитіл шляхом імунізації тварин.
6. Для роботи ППР, у порівнянні з імунохімічними методами, не потрібні мічені імунокомпоненти.
7. Показано лінійну залежність відгуку сенсорна в діапазоні концентрацій IgG (від 2 до 10 мкг/мл), що дозволить проводити визначення концентрації IgG в експериментальних зразках за допомогою калібрувальної кривої.
8. Оскільки SPA взаємодіє з імуноглобулінами класу G багатьох видів тварин і людини, його застосування дозволяє створити "універсальну" імуносенсорну платформу, що не можливо у випадку анти-IgG антитіл.
9. Біоселективний елемент, заснований на SPA-Cys може бути використаний для орієнтованої іммобілізації антитіл проти різноманітних антигенів, а також для експрес скринінгу імунологічного статусу організму.

ДЯКУЮ ЗА УВАГУ!