

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА СВИНОГО ЛЕЙКОЦИТАРНОГО α - ИНТЕРФЕРОНА

ИММУНОФЕРМЕНТНЫМИ МЕТОДАМИ

Н.Н. Нашкевич, М.И. Потапович, С.А. Ульянченко, Н. Г. Заяц, В. А. Прокулевич

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

Система интерферонов является одной из важнейших составляющих естественного (врожденного) иммунитета млекопитающих [1]. Благодаря своей способности активировать и модулировать действие иммунной системы, интерфероны (ИФН) приобретают все возрастающее значение в иммунотерапии и иммунопрофилактике широкого спектра заболеваний человека и животных - вирусных, бактериальных и паразитарных инфекций [2, 3]. Выраженные антивирусная, антибактериальная, противоопухолевая, иммуномодулирующая и другие активности интерферонов позволяют рассматривать их в качестве перспективных препаратов для ветеринарии, особенно для профилактических мероприятий и лечения тяжелых и до сих пор недостаточно контролируемых вирусных инфекций сельскохозяйственных и домашних животных [4].

Следует отметить видоспецифичность интерферонов [5]. Распространенное использование в ветеринарии гетерологичных препаратов (например, ИФН человека для лечения свиней) имеет относительно низкую эффективность, что приводит к необходимости применения высоких терапевтических концентраций белка, а последнее ведет к развитию побочных реакций в организме животных на чужеродный белок. [6]. Получение и применение ИФН, свойственного данному виду животного, позволит снизить иммуногенность препаратов и решить подобные проблемы.

Ранее, был клонирован ген свиного лейкоцитарного α -интерферона (СВИФН α) в клетках бактерий *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. В результате индуцибельной экспрессии указанного гена, в клетках бактерий происходит накопление рекомбинантного белка с молекулярной массой около 19 кДа [7].

Целью данной работы была идентификация и количественное определение свиного интерферона в клетках рекомбинантных микроорганизмов-продуцентов с помощью иммуноферментных методов, пригодных также для определения СВИФН α в растворах на различных стадиях очистки белка СВИФН α и в составе новых лекарственных препаратов на его основе.

Методы исследования

Антитела. В работе использованы мышинные моноклональные антитела (МКА) против СВИФН α («AbD Serotec», Великобритания); вторичные поликлональные козы антитела (ПКА) против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена («Jackson Immuno Research Europe», США).

Получение препарата очищенного белка СВИФН α из бактериальных телес включений.

Бактерии *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL рIP2403, наследующие плазмиды рЕТ24b(+), которые содержат ген свиного лейкоцитарного α -интерферона [7], культивировали в LB-бульоне с 20 мкг/мл канамицина при 37 °С с перемешиванием (180 об/мин) до оптической плотности $OP_{595}=0,6-0,8$, после чего в среду добавляли индуктор изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,5 мМ, культивировали еще 4 ч; осаждали 5 мин при 7000g. Клеточный осадок промывали в 15мМ Na-фосфат, 1мМ ЭДТА, pH 7,5, ресуспендировали в том же буфере. Клетки разрушали под давлением 17 атм. на проточном дезинтеграторе «EmulsiFlex-C5» (Avestin).

Полученную массу центрифугировали 20 мин при 10000g и +4 °С, отделяли супернатант от осадка телец включения. Осадок отмывали в том же буфере и растворяли в буфере следующего состава: 7М гуанидингидрохлорид, 20мМ Na-фосфат, 1мМ ЭДТА, рН 6,0 (в соотношении 1:10 к объему клеточной суспензии, взятой для осаждения). Инкубировали 2 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Добавляли сульфит натрия до 30 г/л. Смесь инкубировали 12 часов при комнатной температуре при интенсивном перемешивании. Белки обессоливали хроматографией на колонке объемом 220 мл с Sephadex G25 в буфере состава: 50мМ Na-фосфат, 1мМ ЭДТА, 100 мМ NaCl, рН 6,0. Далее белок очищали гель-фильтрацией на колонке с Sephadex G50, уравновешенной тем же буфером [8]. Концентрацию белка измеряли методом Брэдфорд [9].

ДСН-ПААГ-электрофорез и Вестерн-блоттинг белков.

Для электрофореза и блоттинга использовали маркеры молекулярного веса белков SM0431 либо SM0671 фирмы «Fermentas» (Литва).

Очищенные рекомбинантные белки, а также белки бактериальных клеток и клеточных фракций анализировали электрофоретически. Для этого 150 мкл бактериальной культуры осаждали центрифугированием (7000g, 2 мин) и ресуспендировали в 15 мкл буфера для образцов (50 мМ Трис-НСl, рН 6,8; 5% додецилсульфат натрия (ДСН); 1,4 М 2-меркаптоэтанол; 10% глицерин; 0,05% бромфеноловый синий). Клеточные пробы (по 15 мкл на дорожку), а также пробы белков в том же буфере (0,05-10 мкг на дорожку) кипятили 5 мин. Проводили электрофорез белков по Лэммли [10] в 16% полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях в аппарате модели TV100Y («Consort», Бельгия) при 20 мА и 150В в течение 2 часов в Трис-глицериновом буфере с 0,1% ДСН. Гель окрашивали в растворе Кумасси синего R250.

При проведении Вестерн-блоттинга осуществляли перенос белков из ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану «Hybond-C» («Pharmacia», Швеция) в аппарате для электропереноса («Hoefer», Германия) 2 часа при 300 мА. После блоттинга для локализации антигена мембрану инкубировали в течении 1 часа со специфическими МКА в концентрации 1 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере с добавлением 0,05% Твина и 0,5% бычьего сывороточного альбумина («VovoStar», Австралия) (ФСБ-БСА-Твин) при 22 °С с перемешиванием при 80 об/мин. Специфические антигенные полосы на мембране выявляли с помощью вторых (анти-мышинных) антител, меченных пероксидазой, взятых в разведении 1:5000 в ФСБ-БСА-Твин, после трехкратной отмывки несвязавшихся антител раствором ФСБ-Твин в присутствии субстратной смеси с 3,3'-диаминобензидином (DAB/NiCl₂) («Sigma»). Останавливали реакцию дистиллированной водой.

Конкурентный твердофазный ИФА для количественного определения СвИФНа.

Имуноферментный анализ (ИФА) проводили в 96-луночных планшетах для ИФА фирмы «Sarstedt» (Германия) в объеме 100 мкл на лунку на всех стадиях. Антиген СвИФНа в концентрации 0,3 мкг/мл сорбировали на твердой фазе в карбонатном буфере, рН 9,6 в течение 12 часов при +4 °С. Все последующие стадии проводили в инкубационном буфере ФСБ-БСА-Твин в течение 1 часа при +22 °С. После каждого шага инкубации, несвязавшиеся компоненты трижды отмывали раствором ФСБ-Твин. На стадии внесения МКА к СвИФНа одновременно добавляли жидкофазный конкурирующий белок СвИФНа в различных концентрациях (4-300 нг/мл). Далее вносили раствор конъюгата ПКА против иммуноглобулинов мыши с пероксидазой хрена. Визуализацию комплексов антиген-антитело проводили с помощью субстратной смеси на основе тетраметилбензидина («AppliChem», Германия). Реакцию останавливали 5% серной кислотой, оптическую плотность регистрировали при 450 нм.

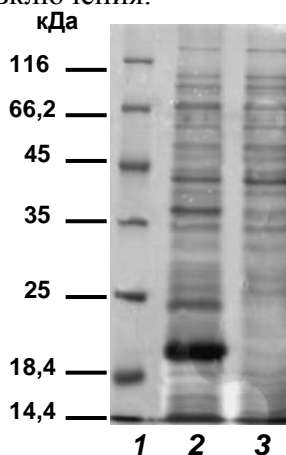
Результаты и обсуждение

Ранее электрофоретическими методами показано, что после индукции ИПТГ в клетках бактерий *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, содержащих рекомбинантную плазмиду рIP2403 с геном свиного лейкоцитарного α -интерферона, накапливается белок с

молекулярной массой около 19 кДа, соответствующий по размеру свиному лейкоцитарному α -интерферону [7].

При индуцибельной экспрессии рекомбинантные белки могут секретироваться, либо накапливаться внутриклеточно. В большинстве случаев при суперпродукции рекомбинантных белков в клетках *E. coli* происходит формирование телец включения - конгломератов плотно упакованных гетерологичного и собственных белков бактерий, которые выделяются из клеток в виде плотного осадка после их разрушения [11].

Локализацию белка СВИФНа в клетках бактерий *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL рIP2403 определяли электрофоретически после дезинтеграции клеток индуцированной культуры и отделения нерастворимых клеточных белков путем центрифугирования. Рисунок 1 показывает, что в осадке (дорожка 2), наряду с бактериальными белками в довольно высоком количестве присутствует белок, соответствующий по размеру СВИФНа (19к Да). Супернатант же, собранный после центрифугирования дезинтеграта (дорожка 3), содержит различные растворимые бактериальные белки, но лишен белка размером 19 кДа. Данные позволяют сделать вывод о том, что рекомбинантный белок СВИФНа в клетках *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL рIP2403 накапливается в тельцах включения.



- 1 – белки-стандарты молекулярной массы (Fermentas SM0431);
- 2 – осадок нерастворимых клеточных белков бактерий *E. coli* BL21 (λ DE3) рIP2403 (4 часа индукции ИПТГ) после разрушения клеток на проточном дезинтеграторе «EmulsiFlex-C5» и центрифугирования при 10000g (тельца включения)
- 3 - белки супернатанта (растворимая фракция) после разрушения и центрифугирования тех же клеток

Рисунок 1 - ДСН-ПААГ-электрофореграмма водорастворимых и нерастворимых клеточных белков бактерий *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL рIP2403 после дезинтеграции

Осадок телец включения растворяли в присутствии сильного денатурирующего агента гуанидингидрохлорида, проводили окислительный сульфитоллиз сульфитом натрия, после чего белки обессоливали на колонке с Sephadex G25. После освобождения от высокомолекулярных белковых примесей в ходе хроматографии на колонке с Sephadex G50, был получен очищенный препарат СВИФНа, который использовали для дальнейшего анализа и разработки иммуоферментных методов идентификации и количественного определения свиного ИФНа.

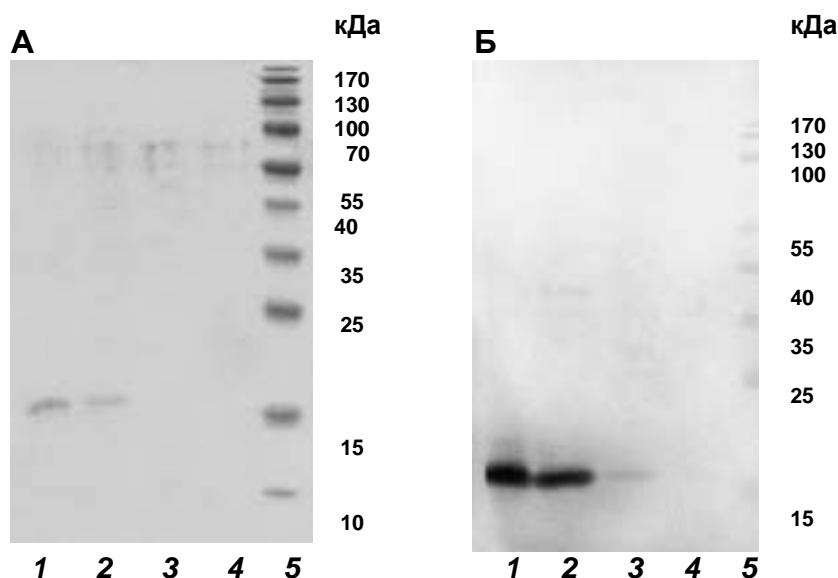
Так как электрофорез белков позволяет судить лишь об их молекулярной массе, но не дает информации об аминокислотной последовательности и строении, следующей задачей была точная идентификация полученного рекомбинантного белка с СВИФНа. Доказательство подлинности СВИФНа было получено при помощи иммуоблоттинга – наиболее специфичного и чувствительного иммуоферментного метода (рис.2).

После электрофореза белков в 16% ПААГ в денатурирующих условиях (рис. 2А) проводился Вестерн-блоттинг (электроперенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану для воспроизведения картины электрофоретического разделения) с последующим иммунохимическим окрашиванием антигенных полос на мембране. Моноклональное антитело против свиного ИФНа, из всей смеси белков специфически связывалось только с рекомбинантным белком СвИФНа в области 19 кДа (рис. 2Б).

Итак, в клетках бактерий *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL рIP2403 накапливается белок с молекулярной массой и антигенными свойствами свиного ИФНа.

К преимуществам метода иммуноблоттинга можно отнести возможность его применения для количественной оценки содержания белка СвИФНа в пробах различного происхождения и состава, где белок может находиться в нерастворимом состоянии, содержать белковые и химические примеси, затрудняющие его определение другими методами. Так, в разведенном 10-кратным шагом образце бактериальной суспензии штамма-производителя (рис. 2, дорожки 2, 3, 4) можно оценить количество белка ИФН по силе визуализирующего сигнала при его обнаружении, зависящей от степени разведения образца, пользуясь данными для стандартного белка СвИФНа в известной концентрации (дорожка 1). Таким образом, в образце на дорожке 2 обнаруживается около 500 нг СвИФНа, если реферировать к силе сигнала для 750 нг стандартного белка на дорожке 1.

Следует отметить высокую чувствительность определения СвИФНа в иммуноблоттинге (рис. 2А) по сравнению с электрофорезом (рис. 2Б): нанограммовые количества белка слабо обнаруживаются электрофоретически, тогда как методом иммуноблоттинга можно обнаружить даже около 50 нг белка (рис. 2Б, дорожка 3).



А – ДСН-ПААГ-электрофореграмма препаратов СвИФНа;

Б – антигенные полосы на нитроцеллюлозной мембране после электропереноса белков из геля, показанного в А: специфическое распознавание белка свиного ИФН моноклональным антителом при Вестерн-блоттинге.

Полосы соответствуют расположению образцов в А и Б:

1 - белок СвИФНа (750 нг) после стадий растворения телец включения и обессоливания на Sephadex G25;

2, 3, 4 - образцы клеточных белков бактерий *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL (после 4 часов индукции ИПТГ бактериальную суспензию (150 мкл) осаждали и ресуспендировали в 15 мкл буфера для образцов) разведение 1:10, 1:100 и 1:1000, соответственно (5 мкл/дорожку);

5 - маркер молекулярной массы белков (Fermentas SM0671).

Рисунок 2. Идентификация СвИФНа методом иммуноблоттинга

Для идентификации и количественного определения растворимых интерферонов существует достаточное количество методов. Но не все из них являются простыми и высокочувствительными. Иммуноферментный анализ является наиболее специфичным, чувствительным, безопасным и характеризуется относительной быстротой и простотой выполнения.

В связи с этим была поставлена задача разработать вариант твердофазного конкурентного ИФА для определения концентрации белка свиного ИФН с использованием специфических мышинных моноклональных антител к свиному ИФН₁ (МКА). Принцип анализа основан на конкуренции свободного (определяемого) и иммобилизованного на твердой фазе антигенов СвиФН₁ за центры связывания специфических мышинных антител. Количество прореагировавших с твердофазным антигеном антител определяют с помощью вторичных антител (конъюгированных с пероксидазой хрена поликлональных антител против иммуноглобулинов мыши). Количество определяемого СвиФН₁ обратно пропорционально регистрируемой оптической плотности продукта ферментативной реакции в присутствии субстрата для пероксидазы.

ВАЖНУЮ РОЛЬ В ПРОВЕДЕНИИ КОНКУРЕНТНОГО ИФА ИГРАЕТ ПРАВИЛЬНЫЙ ПОДБОР КОНЦЕНТРАЦИЙ ТВЕРДОФАЗНОГО АНТИГЕНА И ЖИДКОФАЗНОГО АНТИТЕЛА, ЧТО ОБЕСПЕЧИВАЕТ ЭФФЕКТИВНУЮ КОНКУРЕНЦИЮ СВОБОДНОГО АНТИГЕНА ЗА СВЯЗЫВАНИЕ С АНТИТЕЛОМ. ОПТИМАЛЬНЫМИ СЧИТАЮТСЯ КОНЦЕНТРАЦИИ, ПРИ КОТОРЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТВЕРДОФАЗНОГО АНТИГЕНА (В НАШЕМ СЛУЧАЕ - СВИФН₁) С АНТИТЕЛОМ (МКА) ДАЕТ ЗНАЧЕНИЕ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ В ИФА, ПРИБЛИЖЕННОЕ К ЕДИНИЦЕ. ПОЭТОМУ НА ПЕРВОМ ЭТАПЕ ПРОВОДИЛСЯ ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ СВИФН₁ И МКА МЕТОДОМ «ШАХМАТНОЙ ДОСКИ» В ПЕРЕКРЕСТНОМ ТВЕРДОФАЗНОМ ИФА (НЕ ПОКАЗАНО). ОПТИМАЛЬНАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ ТВЕРДОФАЗНОГО СВИФН₁ И ЖИДКОФАЗНОГО МКА СОСТАВИЛА 0,3 МКГ/МЛ В ОБОИХ СЛУЧАЯХ.

Для определения концентрации антигена СвиФН₁ в тестируемой пробе по оптической плотности (ОП) пробы в конкурентном ИФА, сначала необходимо определить зависимость ОП в ИФА от концентрации стандартного раствора конкурентного антигена - рекомбинантного СвиФН₁ с известной концентрацией. Полученная стандартная кривая изображена на рисунке 3.

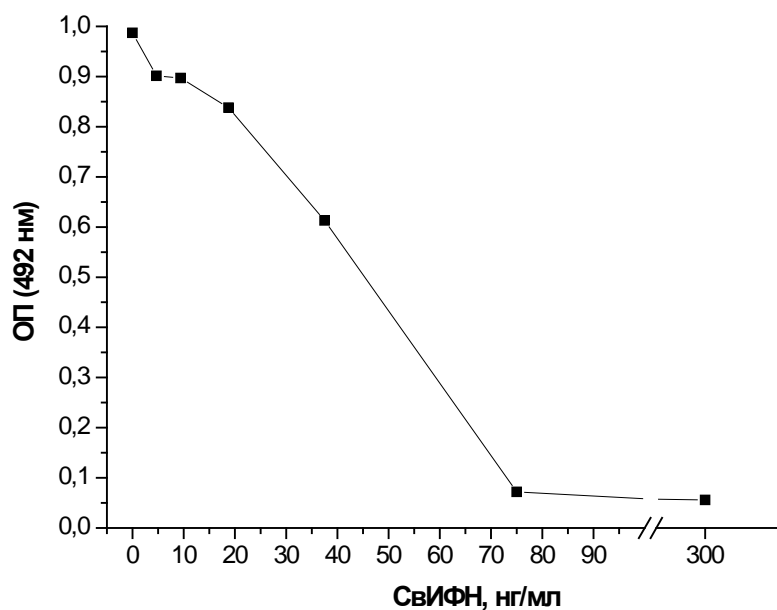


Рисунок 3 - Кривая зависимости ОП (450 нм) от концентрации конкурентного антигена СвиФНа в твердофазном конкурентном ИФА

Анализируя зависимость, изображенную на рисунке 3, можно сказать, что значение ОП обратно пропорционально концентрации внесенного конкурентного антигена СвиФНа. При концентрации СвиФНа 75 нг/мл и выше происходит практически полное подавление связывания МКА с сорбированным СвиФНа (ОП=0,2, близкое к фоновому). При концентрации конкурентного СвиФНа от 0 до 10 нг/мл подавления связывания не происходит: значение ОП при таких концентрациях приближается к максимальному в данном ИФА, которое определяется при полном отсутствии конкурирующего агента (ОП около 0,8). Таким образом, на участке кривой, начиная с концентрации 18,75 нг/мл (минимальная ингибирующая концентрация) до 75 нг/мл, возможно количественное определение белка СвиФНа.

Итак, разработанный конкурентный твердофазный ИФА пригоден для количественного анализа СвиФНа в растворах в диапазоне концентраций в разведенных образцах от 20 до 75 нг/мл. Чувствительность анализа составила 37,5 нг/мл, что является абсолютно достаточным для целей определения свиного ИФНа в лизатах клеток рекомбинантных штаммов микроорганизмов-продуцентов, в растворах, полученных на различных стадиях очистки рекомбинантного белка СвиФНа, а также в составе новых жидких лекарственных препаратов на его основе.

Выводы

1. Рекомбинантный белок с молекулярной массой 19 кДа (СвиФНа) депонируется в клетках *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL pIP2403 в тельцах включения.
2. Методом иммуноблоттинга доказана подлинность рекомбинантного белка СвиФНа с молекулярной массой 19 кДа, который имеет антигенные свойства, характерные для свиного лейкоцитарного ИФНа.
3. Разработан твердофазный конкурентный вариант иммуноферментного анализа для количественного определения белка свиного ИФНа с чувствительностью 37,5 нг/мл.

Список литературы

1. Meager A. The Interferons. – Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. – 410 p.

2. Рафальский В.В. Клиническое применение препаратов интерферона. -М., 2000. – С. 5-15.
3. Рафальский В. В. Клиническое применение препаратов интерферона. – Смоленск: Смоленская государственная медицинская академия, 1997. – 233 с.
4. Lowenthal J.W. New Therapeutics for Poultry - Therapeutic applications of chicken interferon gamma (ChIFN- γ) in poultry // A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. – 2001. - Publication No. 01/149. - Project No. CSA-7J. - 26 pp.
5. Волкова М. А. Интерфероны в терапии онкогематологических заболеваний // Вместе против рака. – 2005. - № 1.
6. Herzyk D. J. The immunogenicity of therapeutic cytokines // Current Opinion in Molecular Therapeutics, 2003 - V.5. - P. 167-171.
7. Трубицына М. В., Потапович М. И., Прокулевич В. А. Клонирование и экспрессия гена свиного лейкоцитарного α -интерферона в клетках бактерий *Escherichia coli* // Труды Белорусского государственного университета. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем, 2008. Том 3, часть 1 – С. 80-84.
8. Гавриков А.В., Рязанов И.А., Калужский В.Е., Машко С.В. Зависимость процедуры выделения и очистки рекомбинантного интерферона- α -2 человека от условий его накопления в клетках штамма-продуцента в ходе регулируемого культивирования // Биотехнология. – 2006. - №5. с. 23-31.
9. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. Пер. с англ. // М.: Мир. - 1991. – 482 с.
10. Laemmli V. K. // Nature. – 1970. – V. 227. – P.680-685.
11. Mattson P., Tenhunen T. Purification of His-tagged proteins from inclusion bodies using QuickPick IMAC// Protein Chemistry. – 2003. - TN62300-001. - P. 1-2.