

**Л.Н. Коршун<sup>1</sup>, Л.Н. Мойса<sup>1</sup>, Л.А. Ганова<sup>1,2</sup>, М.И. Вудмаска<sup>1</sup>, Г.В. Ковтонюк<sup>1</sup>,  
Е.К. Киселёва<sup>1</sup>, Н.Я. Спивак<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Акционерное общество закрытого типа Научно-производственная компания «Дианпроф-Мед»,  
ул. Светлицкого, 35, а/я 56, Киев, 04123, Украина

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, Д03680, Украина

## **ВЛИЯНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* НА ЭКСПРЕССИЮ РАСТВОРИМОГО БЕЛКА – РЕКОМБИНАНТНОГО АНАЛОГА ГЛИКОПРОТЕИНА G ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА 2 ТИПА**

Показано, что рекомбинантный белок GST-HSV2gG, содержащий иммунодоминантные области гликопротеина G ВПГ-2, в экспрессирующей клеточной системе бактерий *Escherichia coli* BL21(DE3) накапливается как в виде телец включений, так и в растворимой форме. При этом соотношение между белковыми фракциями варьирует в зависимости от физиологического состояния клеток перед запуском биосинтеза. Методом математического моделирования кривых роста, на основе применения логистической функции Ферхюльста, определены кинетические показатели роста бактериальной популяции. Установлено, что индукция биосинтеза в фазе ускорения роста культуры (при  $ОП_{600} = 0,3$  о.е.) с использованием 0,1 мМ ИПТГ позволяет получить максимальный выход растворимого белка (26,75 мг/л или 17,6 мг/г биомассы).

Разработан метод двухэтапной хроматографической очистки целевого продукта с применением технологий иммобилизованной металл-аффинной и аффинной хроматографий.

Антигенная активность растворимого белка GST-HSV2gG достоверно (в три раза) превышала величину активности рекомбинантного белка, очищенного из телец включений ( $p < 0,05$ ) и была сопоставима с аналогичным показателем коммерческого образца ( $p > 0,05$ ), что позволяет использовать полученный препарат в составе иммуносорбента тест-системы для диагностики IgG к ВПГ-2.

**Ключевые слова:** рекомбинантные белки, фазы роста бактериальной популяции, математическое моделирование кривых роста, вирус простого герпеса 2 типа, иммуноферментный анализ.

Экспрессирующая клеточная система бактерий *Escherichia coli* – наиболее изученная и широко используемая экспериментальная модель для получения чужеродных белков про- и эукариотического происхождения, на основе которых разрабатывают лекарственные и диагностические препараты нового поколения.

При высоком уровне экспрессии клонируемых генов рекомбинантные белки могут накапливаться в клетках продуцента в виде нерастворимых агрегатов, получивших название «тельца включений». В таких структурных образованиях белок находится в неактивном, часто денатурированном и связанном с примесями (гидрофобными белками, компонентами клеточной стенки) состоянии, что значительно усложняет процесс получения заданного продукта в биологически активной форме. Кроме того, достаточно сложно отделить ренатурированный белок от его олигомерных форм, продуктов неправильного фолдинга и частичного протеолиза [1, 8]. Поэтому для решения проблем, связанных с накоплением рекомбинантных белков в нерастворимом виде, наряду с оптимизацией методов их выделения из телец включений, разрабатываются технологические стратегии, обеспечивающие синтез чужеродного белка в активной растворимой форме.

В настоящее время не существует универсального метода, который позволял бы получать рекомбинантные белки в нативной форме. Тем не менее, в научной литературе достаточно хорошо описаны технологические подходы, способствующие накоплению целевого белка в растворимом виде. Например, такие как снижение температуры культивирования микроорганизмов [14, 20], уменьшение концентрации химического индуктора в питательной среде [7, 20], повышение содержания молекулярных шаперонов, участвующих в фолдинге белка [10, 11], оптимизация состава питательных сред и т.д. [11, 15]. Кроме того, в последнее время разработано большое количество экспрессирующих векторов, позволяющих получать слитные гибридные полипептиды с аффинными тагами, значительно повышающими растворимость целевых продуктов [12, 18].

© Л.Н. Коршун, Л.Н. Мойса, Л.А. Ганова, М.И. Вудмаска, Г.В. Ковтонюк, Е.К. Киселёва, Н.Я. Спивак, 2011

Но, несмотря на все имеющиеся знания относительно механизмов экспрессии и биосинтеза гетерологичных белков в микробных клетках, подбор факторов, влияющих на растворимость белков, остаётся актуальной задачей при оптимизации биотехнологий получения высокоактивных препаратов. Кроме того, как показал литературный анализ, еще недостаточно внимания уделяется вопросу оценки физиологического состояния клеток перед запуском механизма экспрессии чужеродных белков [16].

Цель настоящей работы состояла в том, чтобы на модели штамма *E. coli* BL21(DE3)/pET28-GST-HSV2gG – продуцента рекомбинантного аналога гликопротеина G вируса простого герпеса 2 типа (ВПГ-2) изучить влияние физиологического состояния бактериальной популяции на уровень накопления и свойства растворимой фракции рекомбинантного белка GST-HSV2gG.

**Материалы и методы.** *Бактериальные штаммы и плазмиды.* Штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3)/pET28-GST-HSV2gG был создан на основе вектора pET28a (Novagen) путём клонирования последовательности глутатион-S-трансферазы (GST) и фрагментов иммунодоминантных участков гликопротеина G ВПГ-2 с использованием экспрессирующей системы реципиента *Escherichia coli* BL21(DE3) [*E. coli* B F' dcm ompT hsdS ( $r_b^- m_b^-$ ) gal  $\lambda$ (DE3)] из музея штаммов микроорганизмов НПК “Диапроф-Мед“. В полученной генно-инженерной конструкции транскрипция клонированного гена контролируется промотором гена 10 фага T7, а биосинтез целевого продукта индуцируется с помощью химического соединения - изопропил- $\beta$ -тиогаалактопиранозид (ИПТГ).

Приготовление компетентных клеток *E. coli* BL21(DE3) и их трансформацию рекомбинантной плазмидой проводили согласно стандартным протоколам [3]. Смесь бактериальных клеток высевали на агаризованную среду LB (1 % бактотриптона, 0,5 % дрожжевого экстракта, 1 % NaCl, 1,5 % агара “Дифко”), содержащую селективный антибиотик канамицин в конечной концентрации 25 мкг/мл. Для отбора наиболее продуктивного клона образцы биомасс анализировали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях в 12 % ПААГ в присутствии 1 % SDS с последующим окрашиванием геля раствором Кумасси R-250 по методу Лэммли. Содержание целевого белка в бактериальных клетках оценивали путем денситометрии электрофореграмм с использованием компьютерной программы TotalLab.

*Культивирование штамма-продуцента.* Ночную культуру бактерий, выращенную на среде LB в течение 16-18 часов при температуре 30 °С в присутствии селективного антибиотика, пересевали в разведении 1:30 на свежую питательную среду среду ТВ (1,2 % бактотриптона, 2,4 % дрожжевого экстракта, 55 мМ глицерина, 17 мМ  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 72мМ  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,2) и дальнейшее культивирование продуцента проводили при температуре 37 °С в условиях интенсивного перемешивания (220 об/мин) и аэрации. Динамику роста микробной популяции контролировали путем измерения оптической плотности (ОП) клеток на спектрофотометре (Ultrospec 2000) при длине волны 600 нм. При достижении значений  $\text{ОП}_{600}=0,3\text{о.е.}$  или  $\text{ОП}_{600}=1\text{о.е.}$  в культуральную среду добавляли ИПТГ для индукции биосинтеза целевого белка. Динамику накопления целевого продукта изучали в ходе отбора образцов биомасс в определенный момент роста культуры с последующим их анализом в 12% ПААГ-SDS. После завершения культивирования бактериальную суспензию осаждали путём центрифугирования при 8000g в течение 15 мин.

*Математическое моделирование кривых роста бактериальной популяции.* Экспериментальные кривые роста бактериальной популяции аппроксимировали с помощью логистической функции Ферхюльста [6]:

$$x = \frac{A - C}{1 + 10^{\alpha + \beta \cdot t}} + C, \quad (1)$$

где  $x$  – оптическая плотность бактерий,  $\text{ОП}_{600}$ ;  $t$  – время роста культуры, ч;  $A$  – верхняя асимптота функции (максимальное значение  $\text{ОП}_{600}$ );  $C$  – нижний предел, с которого начинается рост функции (начальное значение  $\text{ОП}_{600}$ );  $\alpha$  и  $\beta$  – кинетические параметры, определяющие наклон, точку перегиба и форму логистической кривой.

Расчет кинетических показателей  $\alpha$  и  $\beta$ , критических точек роста –  $T_1$  (точка максимального ускорения роста),  $T_e$  (точка перегиба сигмоидной кривой),  $T_2$  (точка максимального отрицательного ускорения – торможения роста), а также вычисление абсолютной ( $dx/dt$ ) и удельной ( $\mu$ ) скоростей роста производили согласно ранее опубликованной методике [4].

Результаты опытов анализировали в соответствии с общепринятыми статистическими подходами. Достоверность различий устанавливали с помощью вычисления  $t$ -критерия Стьюдента, а адекватность математической модели оценивали на основе критерия Фишера ( $F$ -тест) с использованием регрессионного и дисперсионного анализов [2].

*Получение очищенных препаратов рекомбинантного белка.* Для получения рекомбинантного белка осадок бактериальных клеток ресуспендировали в лизирующем буфере, содержащем 0,1 мг/мл лизоцима, 0,1 % Тритона X-100, 1мМ PMSF, 0,2 М NaCl, pH 8,0. Клеточную суспензию трижды замораживали-оттаивали, добавляли ДНК-азу (Sigma, США) в конечной концентрации 6 ед/мл в присутствии 20 мМ MgSO<sub>4</sub>. После инкубации в течение 1 часа бактериальную суспензию обрабатывали ультразвуком на дезинтеграторе УЗДН-А (6 раз по 10 с). Надосадочную жидкость и тельца включения разделяли путем центрифугирования при 11 000 g в течение 25 мин при 10 °С. Тельца включения, предварительно отмытые в буферных растворах, содержащих детергенты (0,5 % Тритона X-100, 0,1 % Твина 20), растворяли в буфере с 8 М мочевиной, 20 мМ натрий-фосфата и 0,2 М NaCl при pH 8,0.

Очистку белка осуществляли с помощью хроматографической системы «Bio-Rad» (США) с использованием метода иммобилизованной металл-аффинной хроматографии (ИМАХ) на основе сорбента IDA-toyopearl (TOSOH, Япония), предварительно активированного ионами никеля согласно рекомендации фирмы-производителя. Элюцию проводили ступенчатым способом различными концентрациями имидазола (от 60 до 300 мМ). При накоплении растворимой формы белка в клетках *E.coli BL21(DE3)/pET28-GST-HSV2gG*, его дальнейшую доочистку осуществляли методом аффинной хроматографии с применением глутатион-сефарозы (Amersham, США). В этом случае белок элюировали раствором 10 мМ восстановленного глутатиона в 50 мМ ТрисHCl, pH 8,0. Концентрацию белка измеряли биуретовым методом.

Белковые фракции анализировали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях с использованием 12 % ПААГ-SDS по методу Лэммли. Удельное содержание целевого белка в исследуемых фракциях оценивали путём денситометрии электрофореграмм на основе компьютерной программы TotalLab.

*Иммуноферментный анализ.* Для тестирования в ИФА использовали 30 образцов сывороток крови человека, 16 из которых содержали, а 14 не содержали антитела класса G к ВПГ-2. Все сыворотки предварительно были подтверждены в иммуноферментных тест-системах «Herpes Simplex Virus HSV-Type 2 IgG-ELISA» (Ltd. Nova Tec, Германия) и «HSV 2-IgG» (Ltd. Immulite, США).

Антигенные свойства очищенных белковых препаратов исследовали с использованием тест-системы в формате непрямого ИФА. Для приготовления иммуносорбента применяли полистироловые 96-луночные планшеты (Nunc), в лунки которых сорбировали исследуемые рекомбинантные белки в 0,05М карбонат-бикарбонатном буфере (pH 9,6).

В качестве референс-образца использовали рекомбинантный белок HSV2-gG2c (Ltd. Viral Therapeutics, США).

Специфические иммунные комплексы антиген-антитело выявляли с помощью конъюгата мышиных моноклональных антител с пероксидазой хрена («Диапроф-Мед»).

В качестве проявителя иммуноферментной реакции использовали хромоген тетраметилбензидин (ТМБ), разведенный в цитратном буфере с добавлением перекиси водорода. Реакцию останавливали путем добавления 0,5М раствора серной кислоты. Определение оптической плотности (ОП) проводили на спектрофотометре Labsystems Multiskan (Финляндия) в двухволновом режиме 492/620 нм.

Результаты ИФА рассчитывали по формуле:

$$A = (cp \cdot ОП^+) / (cut \ off), \quad (2)$$

где в числителе ( $cp \cdot ОП^+$ ) – среднее значение оптической плотности, полученное при тестировании положительных сывороток, а в знаменателе показатель  $cut \ off$  – граничное значение,

величину которого рассчитывали как среднее значение оптической плотности при тестировании отрицательных сывороток с прибавлением коэффициента 0,2:  $cut\ off = (cp.OIT) + 0,2$ .

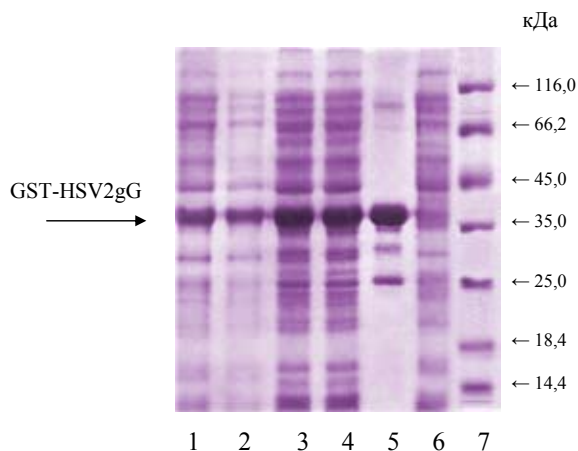
Каждый образец сывороток исследовали в четырёх повторах. Статистическую обработку полученных данных проводили стандартными методами с использованием *t*-критерия Стьюдента [2].

**Результаты и их обсуждение.** Известно, что простой герпес (*Herpes simplex*) – хроническая рецидивирующая инфекция, возбудитель которой в организме человека встречается в виде двух серотипов – вирус простого герпеса 1 и 2 типов (ВПГ-1 и ВПГ-2) [19]. Заболевания, вызываемые ВПГ-2, обычно протекают тяжелее, с более частыми рецидивами и осложнениями. [9]. В связи с этим для определения схемы лечения больных и стратегии обследования населения в клиничко-лабораторных исследованиях проводят дифференциальную диагностику ВПГ-1 и ВПГ-2 [9,13]. При этом, как правило, используют методы, позволяющие выявлять IgG антитела к данному вирусу, поскольку они присутствуют в организме больного пожизненно, независимо от стадии заболевания. В серодиагностике вируса простого герпеса наиболее широкое распространение получил метод твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). При разработке коммерческих тест-систем в качестве антигенов применяют как очищенные лизатные белки вируса, так и их рекомбинантные аналоги. Наиболее часто в составе иммуносорбента используют рекомбинантные белки gG-1 и gG-2 – аналоги природного гликопротеина gG, расположенного на поверхностной оболочке вирусных частиц ВПГ-1 и ВПГ-2 и обладающего типоспецифическими свойствами [13,19].

На основе вектора pET28a была создана генно-инженерная плаزمиды – pET28-GST-HSV2gG, продуктом экспрессии которой в бактериальной системе *E. coli BL21(DE3)* является рекомбинантный полипептид, содержащий иммунодоминантные участки гликопротеина G ВПГ-2, слитные с аффинным тагом *His6-tag* из шести гистидиновых остатков и аминокислотной последовательностью глутатион-S-трансферазы GST (GST-HSV2gG).

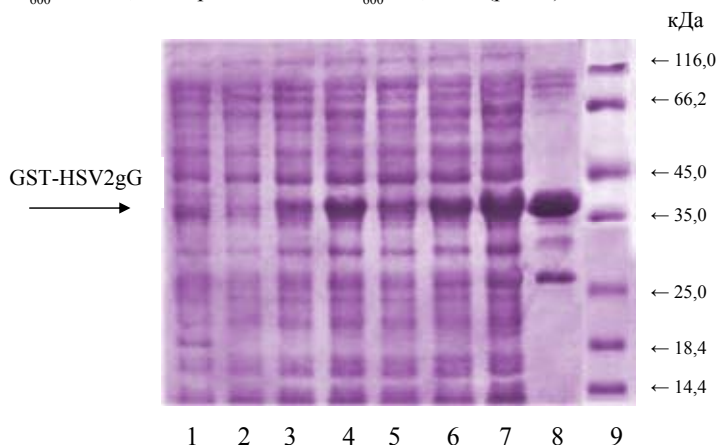
Стратегия отработки условий бактериальной экспрессии рекомбинантных белков предусматривает подбор оптимальной концентрации химического индуктора в питательной среде. Чаще всего в биотехнологических процессах применяют ИПТГ в конечной концентрации 1 мМ. Однако в некоторых случаях эффективный микробный синтез может быть достигнут при использовании ИПТГ в концентрации 0,1 мМ и меньше [7]. С другой стороны, высокие концентрации индуктора могут стимулировать образование целевого продукта в нерастворимой форме, влиять на его локализацию в клетке и даже угнетать рост бактерий [10,13,17]. Поэтому оптимальная концентрация ИПТГ может колебаться в широких пределах и зависеть от множества факторов. При этом важную роль играет и физиологическое состояние клеток перед началом биосинтеза чужеродного белка, который можно контролировать с помощью индуцибельных промоторов, позволяющих запускать транскрипцию клонированного гена в определенный момент роста микробной популяции.

В наших опытах применяли ИПТГ в двух конечных концентрациях – 0,1 мМ и 1 мМ. Его прибавляли в питательную среду по достижении оптической плотности культуры  $OP_{600} = 0,3$  о.е. или  $OP_{600} = 1,0$  о.е. Из электрофореграммы, представленной на рис. 1, следует, что удельное содержание целевого продукта не зависело от концентрации индуктора. С другой стороны, на этом рисунке хорошо видно, что на уровень накопления белка GST-HSV2gG значительное влияние оказывало физиологическое состояние микробных клеток перед началом индукции. Так, при внесении ИПТГ в среду с оптической плотностью клеток 0,3 о.е. наблюдается более низкий уровень накопления как клеточных белков *E.coli*, так и чужеродного белка, чем при индукции культуры с оптической плотностью  $OP_{600} = 1$  о.е.



**Рис.1. Электрофореграмма накопления рекомбинантного белка GST-HSV2gG в бактериальных клетках в зависимости от конечной концентрации ИПТГ в питательной среде – 0,1 мМ (треки 1 и 3) и 1 мМ (треки 2 и 4) в момент индукции культуры при оптических плотностях  $OP_{600} = 0,3$  о.е. (треки 1 и 2) и  $OP_{600} = 1,0$  о.е. (треки 3 и 4); 5 – хроматографически очищенный белок GST-HSV2gG; 6 – лизат биомассы исходных клеток штамма-реципиента *E.coli BL21(DE3)*; 7 – белки-маркеры молекулярных масс (116,0 кДа –  $\beta$ -галактозидаза, 66,2 кДа – альбумин, 45,0 кДа – овалбумин, 35,0 кДа – лактатдегидрогеназа, 25,0 кДа – Ре-аза *Bsp98I*, 18,4 кДа –  $\beta$ -лактоглобулин, 14,4 кДа – лизоцим, Fermentas, Литва).**

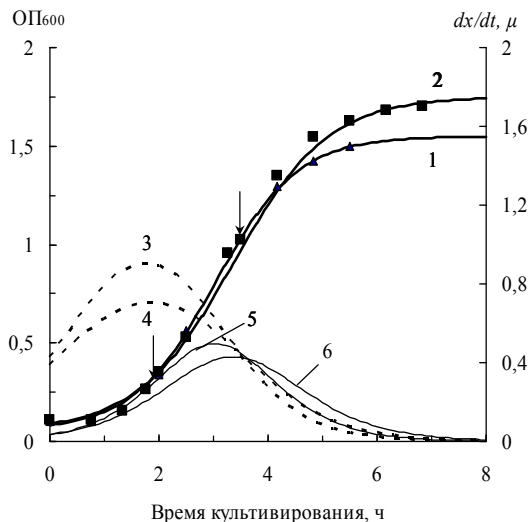
На следующем этапе работы изучали динамику накопления рекомбинантного полипептида GST-HSV2gG в клетках штамма-продуцента в зависимости от физиологического состояния микробной популяции перед началом биосинтеза. Из электрофореграммы, представленной на рис. 2, следует, что максимальный выход целевого продукта в клетках бактерий *E. coli* наблюдается через 3,5 часа после внесения 0,1 мМ ИПТГ. При этом уровень накопления белка GST-HSV2gG был выше в тех клетках, которые индуцировали при оптической плотности культуры  $OP_{600} = 1$  о.е., чем при значении  $OP_{600} = 0,3$  о.е. (рис. 2).



**Рис. 2. Электрофореграмма динамики биосинтеза рекомбинантного белка GST-HSV2gG в клетках штамма-продуцента в зависимости от физиологического состояния культуры в момент индукции:  $OP_{600} = 0,3$  о.е. (треки 2-4) и  $OP_{600} = 1,0$  о.е. (треки 5-7) в течение 1 часа (треки 2 и 5), 2 часов (треки 3 и 6) и 3,5 часов (треки 4 и 7) ферментации при температуре 37 °С; 1 – лизат клеток штамма-реципиента *E.coli BL21(DE3)*; 8 – хроматографически очищенный белок GST-HSV2gG; 9 – белки-маркеры молекулярных масс (Fermentas, Литва).**

Оптимизация условий крупномасштабного производства рекомбинантных белков предусматривает определение фазы роста культуры перед запуском механизма биосинтеза целево-

го продукта. В наших исследованиях для оценки физиологической активности микробных клеток изучали динамику роста продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pET28-GST-HSV2gG в цикле периодического культивирования. Полученные экспериментальные кривые роста имели характерную S-образную (сигмоидную) форму (рис. 3), для аппроксимации которых использовали логистическую функцию Ферхюльста (1).



**Рис. 3.** Кривые роста продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pET28-GST-HSV2gG в зависимости от физиологического состояния культуры в момент индукции биосинтеза рекомбинантного белка. На основной оси ординат (слева) – значение оптической плотности культуры ( $OP_{600}$ ) (жирные сплошные линии 1 и 2); на вспомогательной оси (справа) – показатели удельной ( $\mu$  – пунктирные линии 3 и 4) и абсолютной скоростей роста ( $dx/dt$  – тонкие сплошные линии 5 и 6). Кривые роста 1, 3, 5 соответствуют индукции культуры при  $OP_{600}=0,3$  о.е. (стрелка внизу), а кривые под номерами 2, 4, 6 – индукции культуры при  $OP_{600}=1$  о.е. (стрелка вверх).

Экспериментальные данные (точки) аппроксимированы по модели логистической функции Ферхюльста (1):

$$x = \frac{A - C}{1 + 10^{\alpha + \beta t}} + C,$$

где  $C$  и  $A$  – нижняя и верхняя асимптоты функции, соответственно;  $\alpha$  и  $\beta$  – показатели, определяющие поведение функции. Значение кинетических параметров для кривых: 1 –  $A=1,55$ ,  $C=0,055$ ,  $\alpha=1,742$ ,  $\beta=-0,575$ ; 2 –  $A=1,75$ ,  $C=0,055$ ,  $\alpha=1,671$ ,  $\beta=-0,498$ .

Результаты кинетического анализа кривых роста штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pET28-GST-HSV2gG представлены в табл. 1.

**Таблица 1**

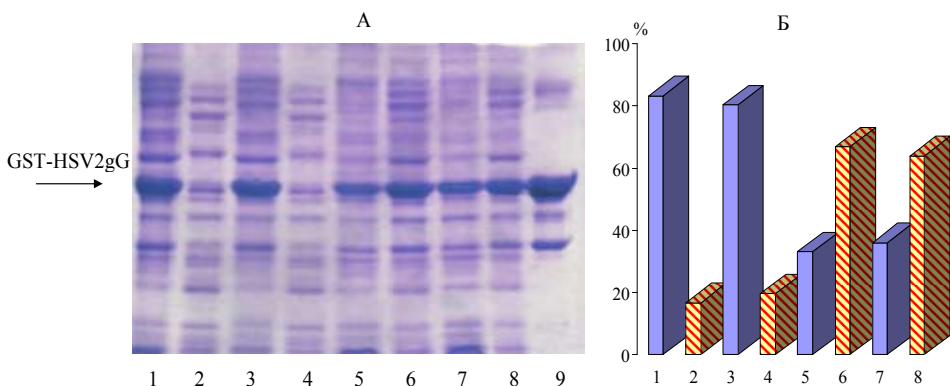
**Кинетические параметры роста бактериальной популяции штамма *E. coli* BL21(DE3)/pET28-GST-HSV2gG в зависимости от физиологического состояния клеток в момент индукции транскрипции целевого гена**

Значение $OP_{600}$ в момент индукции биосинтеза	Фазы роста бактериальной культуры						$\mu_{max}$	$dx/dt_e$
	$T_1$ (точка максимального ускорения роста)		$T_e$ (точка перегиба логистической кривой)		$T_2$ (точка максимального торможения роста)			
	$t_1$	$x_1$	$t_e$	$x_e$	$t_2$	$x_2$		
0,3 о.е.	2,454	0,532	3,026	0,803	3,598	1,073	0,905	0,495
1,0 о.е.	2,786	0,634	3,358	0,902	3,930	1,171	0,707	0,429

**Примечание:**  $t_1, t_e, t_2$  и  $x_1, x_e, x_2$  – время культивирования (ч) и оптическая плотность бактерий (о.е.) для критических точек роста  $T_1, T_e$  и  $T_2$ , соответственно;  $\mu_{max}$  – максимальное значение удельной скорости роста, ч<sup>-1</sup>;  $dx/dt_e$  – абсолютная (валовая) скорость роста популяции в точке перегиба логистической кривой, ОЕ/ч.

Известно, что при описании динамики роста бактериальных популяций выделяют несколько стадий, соответствующих определённой физиологической активности клеток [5]. Вычисление координат критических точек  $T_1(x_p; t_1)$ ,  $T_2(x_2; t_2)$  и точки перегиба  $T_c(x_c; t_c)$  на логистической кривой позволяет разграничить во времени основные фазы роста микробной популяции. Так, подготовительный период, включающий лаг-фазу и фазу ускорения роста, наблюдается от момента внесения инокулята при  $t=t_0$  до момента времени  $t=t_p$ , при котором ускорение роста бактерий достигает своего максимального значения. Почти линейный рост клеток (экспоненциальная фаза) длится в течение интервала времени от  $t=t_l$  до точки перегиба логистической кривой при  $t=t_c$ . Затем наступает фаза замедления роста – период времени от точки  $t=t_c$  до точки времени  $t=t_2$ , которому соответствует максимальное значение отрицательного ускорения (замедления) роста культуры [4]. Полученные в ходе кинетического анализа данные позволяют утверждать, что значение оптической плотности культуры 0,3 о.е. соответствует фазе ускорения роста, а показатель оптической плотности 1,0 о.е. – фазе замедления роста бактериальной популяции (табл. 1).

Учитывая вышеизложенные результаты, несомненный интерес представляла оценка качества и биологической активности рекомбинантного белка в зависимости от фазы роста культуры перед внесением индуктора. В процессе выделения и очистки было установлено, что белок GST-HSV2gG накапливается в клетках штамма-продуцента как в виде тельц включений, так и в растворимой форме. При этом соотношение между белковыми фракциями варьировало в зависимости от физиологического состояния клеток. Так, при индукции культуры в фазе замедления роста ( $ОП_{600} = 1$  о.е.) синтез белка осуществляется преимущественно в виде тельц включений, независимо от концентрации ИПТГ (83,3% и 80,35 % при использовании 0,1 мМ и 1 мМ ИПТГ, соответственно). В случае внесения ИПТГ при значении  $ОП_{600} = 0,3$  о.е. белок GST-HSV2gG накапливается в клетке как в виде тельц включений (33,17 % и 36 %), так и в растворимой форме (66,83 % и 64 %) при индукции 0,1 мМ и 1 мМ ИПТГ, соответственно (рис. 4).

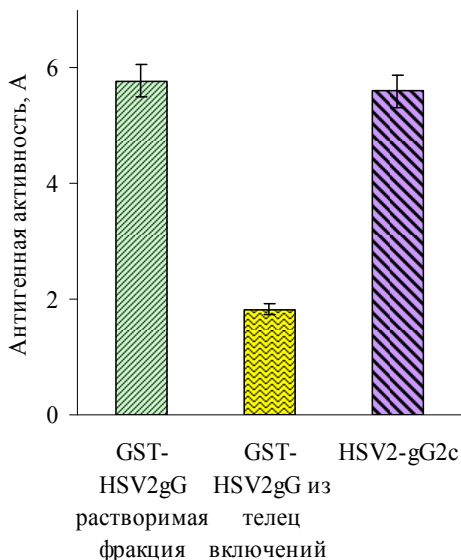


**Рис 4. А:** Электрофореграмма соотношения белковых фракций GST-HSV2gG в образцах биомасс в зависимости от физиологического состояния культуры в момент индукции: при значении  $ОП_{600}=1$  о.е. (треки 1-4) и  $ОП_{600}=0,3$  о.е. (треки 5-8): растворенные в 8 М мочеине тельца включений (треки 1,3,5,7), супернатант после лизиса клеток (треки 2,4,6,8) при использовании ИПТГ в концентрации 0,1 мМ (треки 1,2,5,6) и 1 мМ (треки 3,4,7,8), 9-хроматографически очищенный белок;

**Б:** Диаграмма выхода растворимой формы и нерастворимой фракции (в % от суммарного количества рекомбинантного белка в клетке), полученных в ходе выделения и очистки образцов биомасс (нумерация соответствует трекам на электрофореграмме).

Представленные данные позволяют сделать вывод о том, что физиологическое состояние бактериальных клеток штамма *E. coli BL21(DE3)/pET28-GST-HSV2gG* перед началом биосинтеза оказывает решающее влияние на соотношение белковых фракций экспрессируемого продукта. На наш взгляд, это можно объяснить присутствием меньшего количества клеточных белков *E. coli* до момента индукции, а также отсутствием влияния вторичных метаболитов на фолдинг чужеродного белка, возможно, с участием клеточных шаперонов.

Как уже отмечалось, целевое назначение рекомбинантного аналога гликопротеина G ВПГ-2 – это использование его в качестве антигена в составе иммуноферментной тест-системы для дифференциальной диагностики вируса простого герпеса. Накопление белка в клетках штамма-продуцента *E. coli BL21(DE3)/pET28-GST-HSV2gG* в виде телец включений и в растворимой форме обусловили необходимость исследования антигенных свойств белков, очищенных из обеих фракций. Их качественные характеристики, полученные путем вычисления показателя А по формуле (2), представлены на рис. 5.



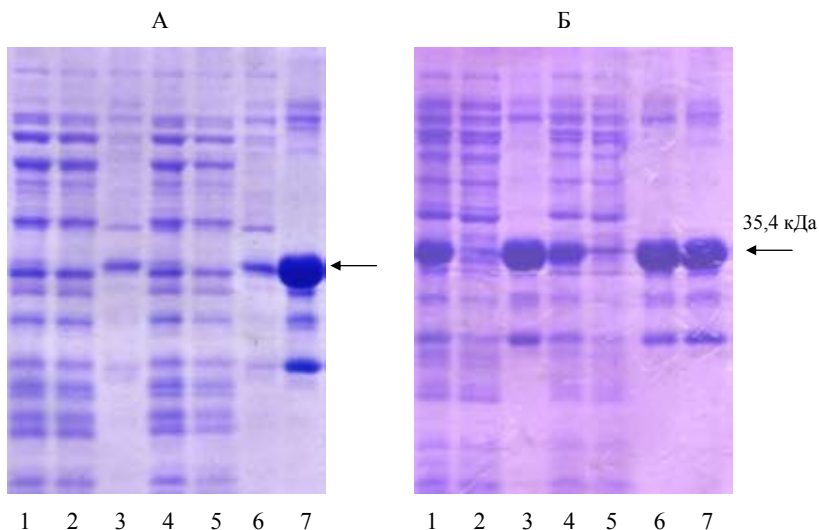
**Рис. 5. Сравнительная оценка антигенных свойств очищенных препаратов белка GST-HSV2gG, полученных из растворимой фракции и телец включений, при использовании их в составе иммуносорбента диагностической тест-системы.**

Результаты наших исследований (рис. 5) хорошо согласуются с литературными данными о более высокой биологической активности растворимых белков по сравнению с теми, которые накапливаются в клетке в форме телец включений [8]. Так, показатель антигенной активности А рекомбинантного белка *GST-HSV2gG*, полученного из супернатанта после лизиса клеточной биомассы, достоверно (в три раза) превышал аналогичный показатель для белка, очищенного из телец включений ( $p < 0,05$ ) и был сопоставим ( $p > 0,05$ ) с коммерческим аналогом гликопротеина G - HSV2-gG2c производства LTD.Viral Therapeutics, США, который применяли в качестве референс-антигена в составе иммуносорбента.

Разработка схемы хроматографической очистки растворимого белка *GST-HSV2gG* проводилась с учетом особенностей его первичной структуры, включающей два аффинных партнера – аминокислотные последовательности *His6-tag* и глутатион-S-трансферазы. На первом этапе очистки применяли метод ИМАХ, основанный на образовании координационной связи между гистидиновыми остатками и ионами никеля на поверхности сорбента. На втором этапе очистки применяли метод аффинной хроматографии с использованием сорбента глутатион-сефарозы. Данный метод основан на взаимодействии молекул глутатион-S-трансферазы и глутатиона, иммобилизованного на носителе. Образующийся комплекс разрушается при элюции целевого белка раствором восстановленного глутатиона. Двухэтапная схема хроматографической очистки позволила повысить специфичность ИФА в 2,2-2,5 раза, не снижая чувствительности данного метода.

Электрофоретический анализ образцов фракций, полученных в ходе хроматографической очистки растворимой формы белка *GST-HSV2gG*, представлен на рис. 6.





**Рис 6.** SDS-ПААГ анализ ИМАХ образцов белковых фракций, полученных из двух биомасс штамма *E.coli BL21(DE3)/pET28-GST-HSV2gG*, индуцированного на различных фазах роста культуры: А – при  $OP_{600}=1$  о.е. (фаза замедления роста) и Б – при  $OP_{600}=0,3$  о.е. (фаза ускорения роста) с использованием 0,1 мМ ИПТГ (треки 1-3) и 1 мМ ИПТГ (треки 4-6); треки 1 и 4 – супернатанты после лизиса биомассы; треки 2 и 5 – белки, не связавшиеся с сорбентом; треки 3 и 6 – хроматографически очищенные препараты белка GST-HSV2gG (стрелками указано положение рекомбинантного белка GST-HSV2gG).

Выходы биомасс и очищенного белка GST-HSV2gG из растворимой фракции клеточного лизата представлены в табл. 2.

**Таблица 2**

**Выход очищенного рекомбинантного белка GST-HSV2gG в зависимости от физиологического состояния клеток штамма-продуцента в момент индукции транскрипции целевого гена**

Физиологическое состояние культуры	Концентрация ИПТГ, мМ	Общий выход биомассы, г/л	Выход очищенного белка	
			в мг/л	в мг/г
фаза ускорения роста ( $OP_{600}=0,3$ о.е.)	0,1	1,52	26,75	17,60
	1	1,76	17,95	10,20
фаза замедления роста ( $OP_{600}=1,0$ о.е.)	0,1	3,88	4,65	1,20
	1	3,48	4,38	1,26

Согласно полученным результатам, проведение индукции биосинтеза с использованием 0,1 мМ ИПТГ в условиях культивирования продуцента *E. coli BL21(DE3)/pET28-GST-HSV2gG* на среде ТВ в фазе ускорения роста позволяет получить максимальный выход растворимой формы рекомбинантного аналога гликопротеина G ВПГ-2 (26,75 мг/л или 17,6 мг/г биомассы). Высокая антигенная активность полученного белка даёт основание использовать его в составе иммуносорбента при разработке диагностических тест-систем для выявления специфических иммуноглобулинов класса G к вирусу простого герпеса человека 2 типа.

**Выводы**

1. Показано, что рекомбинантный белок GST-HSV2gG, содержащий иммунодоминантные области гликопротеина G ВПГ-2, накапливается в клетках продуцента как в виде телец включений, так и в растворимой форме. При этом соотношение между белковыми фракциями варьирует в зависимости от физиологического состояния клеток перед началом биосинтеза. Так, при индукции культуры в фазе замедления роста синтез белка осуществляется преимущественно в виде телец включений, независимо от концентрации ИПТГ (83,30 % и 80,35 % при использовании 0,1 мМ и 1 мМ ИПТГ, соответственно). При внесении ИПТГ в питательную среду в фазе ускорения роста культуры, белок GST-HSV2gG накапливается в клетке как в виде телец включений (33,17 % и 36 %), так и в растворимой форме (66,83 % и 64 %) при индукции 0,1 мМ и 1 мМ ИПТГ, соответственно.

2. Определены кинетические показатели, характеризующие физиологическое состояние бактериальной популяции в цикле периодического культивирования. Установлено, что проведение индукции биосинтеза в условиях ферментации продуцента *E.coli BL21(DE3)/pET28-GST-HSV2gG* на среде ТВ в фазе ускорения роста (при  $OP_{600} = 0,3$  о.е.) с использованием 0,1 мМ ИПТГ позволяет получить максимальный выход растворимого белка (26,75 мг/л или 17,6 мг/г биомассы).
3. Разработана схема двухэтапной хроматографической очистки целевого продукта с использованием технологий иммобилизованной металл-аффинной и аффинной хроматографий с применением сорбентов IDA-toyoreal и глютацион-сефарозы, соответственно.
4. Антигенная активность растворимой формы рекомбинантного белка *GST-HSV2gG*, достоверно (в три раза) превышала аналогичный показатель для белка, очищенного из телец включений ( $p < 0,05$ ) и была сопоставима с активностью коммерческого аналога ( $p > 0,05$ ), что позволяет использовать полученный препарат в составе иммуносорбента тест-системы для диагностики IgG к ВПГ-2.

*Л.М. Коришун<sup>1</sup>, Л.М. Мойса<sup>1</sup>, Л.О. Ганова<sup>1,2</sup>, М.І. Вудмаска<sup>1</sup>, Г.В. Ковтонюк<sup>1</sup>,  
О.К. Кисельова<sup>1</sup>, М.Я. Співак<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Акціонерне товариство закритого типу Науково-виробнича компанія «Діапроф-Мед», Київ  
<sup>2</sup> Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ

## **ВПЛИВ ФІЗІОЛОГІЧНОГО СТАНУ КЛІТИН БАКТЕРІЙ *ESCHERICHIA COLI* НА ЕКСПРЕСІЮ РОЗЧИННОГО БІЛКА – РЕКОМБІНАНТНОГО АНАЛОГУ ГЛІКОПРОТЕЇНУ G ВІРУСУ ПРОСТОГО ГЕРПЕСУ 2 ТИПУ**

### **Резюме**

Показано, що рекомбінантний білок GST-HSV2gG, який містить імунодомінантні ділянки глікопротеїну G ВПГ-2, в експресуючій клітинній системі бактерій *Escherichia coli* BL21(DE3) накопичується як у вигляді тілець включень, так і у розчинній формі. При цьому співвідношення між білковими фракціями змінювалося залежно від фізіологічного стану клітин перед початком запуску біосинтезу. Методом математичного моделювання кривих росту із застосуванням логістичної функції Ферхюльста, визначені кінетичні показники росту бактеріальної популяції. Встановлено, що індукція культури у фазі прискорення росту (при  $OG_{600} = 0,3$  о.о.) з використанням 0,1 мМ ПТГ дозволяє отримати максимальний вихід розчинного білка (26,75 мг/л або 17,60 мг/г біомаси).

Розроблений метод двохетапної хроматографічної очистки цільового продукту із застосуванням технологій іммобілізованої метал-афінної та афінної хроматографій.

Антигенна активність розчинної форми рекомбінантного білка GST-HSV2gG, достовірно (у три рази) перевищувала величину активності білка, очищеного з тілець включень ( $p < 0,05$ ) та не відрізнялась від аналогічного показника комерційного зразку ( $p > 0,05$ ), що дозволяє використовувати отриманий препарат у складі імуносорбенту тест-систем для діагностики IgG до ВПГ-2.

Ключові слова: рекомбінантні білки, математичне моделювання, фази росту мікробної популяції, вірус простого герпесу 2 типу, імуноферментний аналіз.

*L.M. Korshun<sup>1</sup>, L.M. Moysa<sup>1</sup>, L.O. Ganova<sup>1,2</sup>, M.I. Vudmaska<sup>1</sup>, G.V. Kovtonjuk<sup>1</sup>,  
O.K. Kiselyova<sup>1</sup>, M.Ya. Spivak<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>JSC «Diaproph-Med», Kyiv, Ukraine  
<sup>2</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

## **INFLUENCE OF PHYSIOLOGICAL STATE OF *ESCHERICHIA COLI* CELLS ON THE EXPRESSION OF SOLUBLE PROTEIN – RECOMBINANT ANALOG OF GLYCOPROTEIN G OF *HERPES SIMPLEX* VIRUS OF TYPE 2**

### **Summary**

It is shown that the recombinant protein GST-HSV2gG, containing the immunodominant regions of glycoprotein G of HSV-2 is accumulated in the form of inclusion bodies or in soluble form in the *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells. The ratio between protein fractions varied depending on the physiological state of cells before biosynthesis. The kinetic parameters of bacterial populations were determined by mathematical modeling of growth curves based on the Verhulst logistic function. It was established that the induction of biosynthesis in the growth acceleration phase (at  $OD_{600} = 0.3$ ) with 0.1 mM IPTG gives the maximum yield of soluble protein (26.75 mg / l or 17.6 mg / g biomass).

The target protein was purified using the immobilized metal ion affinity and affinity chromatography technologies.

Antigenic activity of the soluble form of recombinant protein GST-HSV2gG, was significantly (three times) higher than that of the protein purified from inclusion bodies ( $p < 0.05$ ) and was comparable with the activity of the commercial analog ( $p > 0.05$ ), that allows using this product in the immunosorbent test kits for diagnosis of IgG to HSV-2.

**Key words:** recombinant proteins, mathematical modeling, physiological state of the culture, *Herpes simplex virus* of type 2, ELISA test.

**The author's address:** L.M.Korshun, JSC «Diaproph-Med», 35 Svetlitsky St., a/b 56, Kyiv, 04123, Ukraine.

1. Гильчук П.В. Оценка методов ренатурации для промышленного получения рекомбинантных белков из телец включения *Escherichia coli* в биологически активной форме // Біополімери і клітина – 2004 – **20**, №3 – С.182-192.
2. Лапач С.Н., Губенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.:Морион, 2002. – 407с.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 479 с.
4. Мойса Л.Н., Чиялков В.А. Математическое моделирование кривых роста штамма *Escherichia coli* – продуцента рекомбинантного белка  $\beta$ -галактозидазы // Біополімери і клітина. – 2004. – **20**, №6. – С.524-529.
5. Печуркин Н.С., Терсков И.А. Анализ кинетики роста и эволюции микробных популяций (в управляемых условиях) / По ред. И.И. Гительзон. – Новосибирск: Наука, 1975. – 216 с.
6. Плохинский Н.А. Биометрия. – М: Изд-во Моск.ун-та, 1970. – 367 с.
7. Славченко И.Ю., Борейко Е.В., Воробей Н.В. Изучение влияния различных концентраций индуктора на выход альфа-2b интерферона человека в системе экспрессии на основе РНК-полимеразы фага T7 в клетках *Escherichia coli* // Біополімери і клітина – 2003 – **19**, №5 – С.457–462.
8. Славченко И.Ю., Борейко Е.В., Воробей Н.В. Влияние различных концентраций глицерина на выход и растворимость рекомбинантной метионинаминопептидазы *Escherichia coli* // Біополімери і клітина – 2003 – **19**, №6 – С.530–535.
9. Ashley R.L., Wald A. Genital herpes: Review of the epidemic and potential use of type-specific serology // Clinic. Microbiol. Reviews – 1999 – **12**, №1. – P. 1-8.
10. Baharum S.N., Rahman RNZRA, Basri M., Chaperone-dependent gene expression of organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* strain S5 // Proc. Biochem. – 2010- **45**. – P.346 – 354.
11. Baneyx F, Recombinant protein expression in *Escherichia coli* // Current Opinion in Biotechnology – 1999 – **10**. – P.411-421.
12. Esposito D., Chatterjee D K Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags // Current Opinion in Biotechnol. - 2006 – **17**. – P. 353-358.
13. Gorander S., Svennerholm Bo., Liljeqvist J-A. Secreted portion of Glycoprotein G of *Herpes simplex Virus* Type 2 Is a Novel Antigen for Type-Discriminating Serology // J. Clin. Microbiol. – 2003 – **41**, №8. – P. 3681-3686.
14. Hartinger D., Heinel S., Schwartz H.E., Grabherr R., Schatzmayr G., Haltrich D., Moll W.-D. Enhancement of solubility in *Escherichia coli* and purification of an aminotransferase from *Sphingopyxis* sp.MTA 144 for deamination of hydrolyzed Fumonisin B // Microbial Cell Factories – 2010 – **9**. – P.62-76.
15. Lian J.Z., Ding S.H., Cai J., et al. Improving aquaporin Z expression in *Escherichia coli* by fusion partners and subsequent condition optimization // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2009 – **82**. – P.463-470.
16. Panda A.K., Khan R.H., Appa Rao K.B.C., Totey S.M. Kinetics of inclusion body production in batch and high cell density fed-batch culture of expressing ovine growth hormone // J. Biotechnol.- 2009 – **75**. – P.161-172.
17. Peng L., Xu Z.N., Fang X.M., Cen P.L. High-level expression of soluble human Beta-Defensin-2 in *E. coli* // Proc. Biochem. – 2004 – **82**. – P.199-205.
18. Rabhi-Essaffi I., Sadok A., Khalaf N., Fathallah D. A strategy for high-level expression of soluble and functional human interferon  $\alpha$  as a GST-fusion protein in *E.coli* // Protein Engineering, Design & Selection – 2007 – **12**. – P.1-9.
19. William L.H., Connie L., Ashley R. Use of a glycoprotein G-Based type-specific assay to detect antibodies to *Herpes simplex virus* type 2 among persons attending sexually transmitted disease // Sexually Transmitted Diseases – 2001. – **28**, N 2. – P 99-104.
20. Zhang D., Wei P., Fan L. Lian J., Huang L., Cai J., Xu Z. High-level soluble expression of HIGF-1 fusion protein in recombinant *Escherichia coli* // Proc. Biochem. – 2010 – **45**. – P.1401-1405

Отримано 21.10.2010