

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің 60 жылдығына арналған «Сейфуллин оқулары– 13: дәстүрлерді сақтай отырып, болашақты құру» атты Республикалық ғылыми-теориялық конференциясының материалдары = Материалы Республиканской научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения – 13: сохраняя традиции, создавая будущее», посвященная 60-летию Казахского агротехнического университета имени С.Сейфуллина. - 2017. - Т.1, Ч.6. - С.157-160

## ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АНАЛОГА БЕЛКА А ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА В КЛЕТКАХ *E.COLI*

*А.Б. Нурмагамбетова, м.н.с., магистр<sup>1</sup>., Д.Г<sup>2</sup>. Ахметова, Б.Б. Хасенов, зав. лаб. к.х.н<sup>1</sup>., К.К. Балтин, с.н.с., к.б.н<sup>1</sup>.*

*РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК<sup>1</sup>, г. Астана  
АО «Республиканский диагностический центр»<sup>2</sup>, г. Астана*

В качестве вторичных антител, наряду с классическими конъюгатами антивидовое антитело+фермент, используют белки бактериального происхождения. Так, белок связанный с клеточной стенкой большинства штаммов золотистого стафилококка связывает молекулы иммуноглобулина с высоким сродством. Свойства данного белка связывать молекулы иммуноглобулинов также широко используется для фракционирования и очистки антител, которые трудно отделить с применением других методов.

Белок А из *Staphylococcus aureus* взаимодействует Fc, (константная часть иммуноглобулины) доменом иммуноглобулинов различных видов, включая человека, и поэтому широко используются при проведении количественных и качественных иммунологических исследованиях [1]. Анализ аминокислотной последовательности белка А показал два функционально различных участков молекулы [2]. Оба региона имеют исключительно повторяющиеся структуры. NH<sub>2</sub>-концевая часть содержит пять гомологичных IgG-связывающих доменов, состоящих из приблизительно 58 аминокислотных остатков каждый. COOH-концевая часть, которая, как полагают, связываются с клеточной стенкой золотистого стафилококка и состоит из нескольких повторяющихся октапептидов (Glu-Asp-Gly-Asn-Lys-Pro-GlyLYS) [3].

Указанные свойства структуры белок А золотистого стафилококка способствуют специфически связывать иммуноглобулины, а способность метится маркерами (радиоизотопы, ферменты, коллоиды металлов и др.) позволяют использовать данный белок в качестве вторичных антител, вследствие чего, белок А широко используется для многих препаративных и аналитических задач в иммунологии. Белок А, как и другие иммуноглобулин-связывающие белки, адсорбированные на частицах коллоидного золота используются для визуализации связывания антител и антигенных сайтов в срезах тканей, клеток и в иммунохроматографическом анализе.

Известно, что *Staphylococcus aureus* относится к патогенным микроорганизмам и способен вызывать инфекционные заболевания. Данное обстоятельство затрудняет рутинное применение золотистого стафилококка в

качестве источника белка А. Однако, современные методы молекулярного клонирования позволяют получить белок А в рекомбинантной форме. Имеются данные о экспрессии рекомбинантного белка А в дрожжах *Pichia pastoris* [4] где целевой продукт экспрессируется в культуральную среду. Другой перспективной экспрессионной системой для получения белка А является *Escherichia coli*. Однако, ранее проведенные исследования показали, что получение полноразмерного белка А в клетках *E.coli* является крайне трудноразрешимой задачей. Решение данной проблемы возможно путем анализа пептидной структуры белка А с дальнейшим получением фьюжен белка, состоящего из иммуноактивных доменов белка А слитых с каким либо инертным в отношении иммуноглобулинов белком кишечной палочки.

Целью работы является получение рекомбинантного фьюжен белка, состоящего из фрагмента белка А *Staphylococcus aureus* слитого с мальтозсвязывающим белком *Escherichia coli*.

Объектом исследования является штамм *Staphylococcus aureus* выделенный из инфекционного материала.

В работе использовались следующие методы исследования: микробиологическое выделение чистой культуры, биоинформатики, биотехнологии, методы молекулярной биологии и генетической инженерии.

Анализ аминокислотной последовательности структуры белка А из данных GenBank показал, что в структуре нативного белка А содержатся: сигнальный пептид, тандемно расположенные пять иммуноглобулин связывающих домена и икс регион на с-конце, который обеспечивает связывание белка на клеточной стенке золотистого стафилококка. Поскольку икс-регион будет играть негативную роль при экспрессии гена белка А в клетках *E.coli* было клонировано только пять иммуноглобулин связывающих сайта белка А. Для получения геномной ДНК был высеян и получена чистая культура штамма *Staphylococcus aureus*. Данная работа была проведена в Республиканском диагностическом центре. Выделение геномной ДНК проводили с использованием набора Genomic Purification Kit (Promega). Далее, фрагмент гена *protein A* из ДНК золотистого стафилококка был амплифицирован методом полимеразной-цепной реакции. Для амплификации использовали праймеры включающие сайты рестрикции NcoI и NotI.

Полученный амплификат клонировали в составе вектора pMBP his parallel 2 по вышеуказанным сайтам рестрикции. Клонирование осуществляли с использованием ферментов нуклеинового обмена. В результате сконструирован экспрессионный вектор в котором в открытой рамке считывания находятся 5 доменов белка А связывающие иммуноглобулины и мальтозсвязывающий белок *E.coli* – MBP (Maltose Binding Protein). На рисунке 1 представлена карта полученной генетической конструкций.

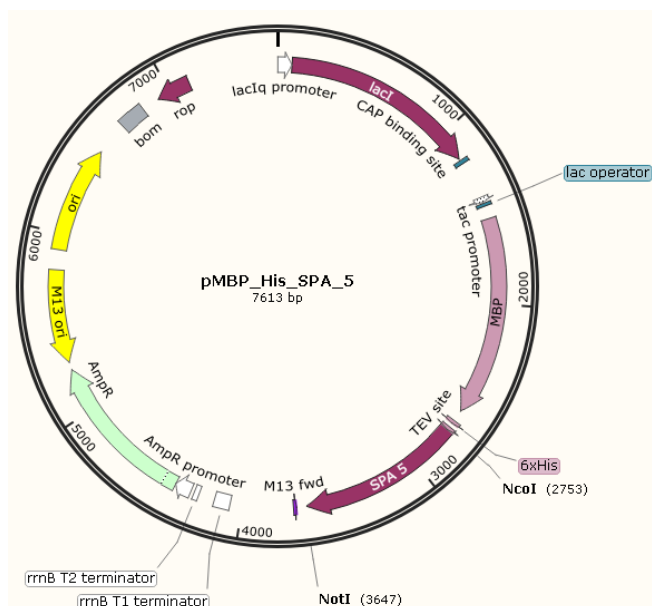


Рисунок 1 – Плазмидная карта вектора pMBP-SPA

Данной конструкцией была трансформированы компетентные клетки *Escherichia coli* штамма BL-21(DE3). Трансформацию проводили методом электропорации. Полученные трансформанты выращивались на агаре с добавлением ампициллина 150 мг/мл, при температуре +37°C. После отбора на твердой питательной среде клоны-трансформанты культивировали в жидкой питательной среде LB на шейкере инкубаторе, при температуре +37°C, до достижения плотности, соответствующей  $OD_{600}=0,6$ . Активацию индукции проводили путем добавления изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид в конечной концентраций 0,5 мМ, после чего, культивировали в течений ночи на орбитальном шейкере роторного типа при 200 об/мин и температуре +37°C. Клетки собирали осаждением при помощи центрифугирования.

Выделение рекомбинантного белка А осуществляли из 400 мл индуцированной культуры. Собранные центрифугированием (6000g, +4°C, 7 минут) клетки были лизированы ультразвуковым дезинтегрированием как описано ранее [5]. Из полученного белкового экстракта выделение белка А слитого с MBP осуществляли металлоаффинной хроматографией на колонке NiTrap Chelating (GE) объемом 1 мл, в качестве лиганда использовали ионы  $Ni^{2+}$ . Очистку проводили в ступенчатом градиенте имидазола с концентрацией: 20 мМ, 50 мМ, 100 мМ и 150 мМ остальными компонентами элюирующего буфера были: 500 мМ NaCl, 20 мМ Hepes-NaOH (pH 7,5).

Полученные элюаты хроматографического разделения рекомбинантного белка А анализировали в 12% ПААГ геле[6]. На рисунке 2 представлены результаты электрофоретического разделения очищенного белка А в комплексе с мальтозасвязывающим белком MBP.

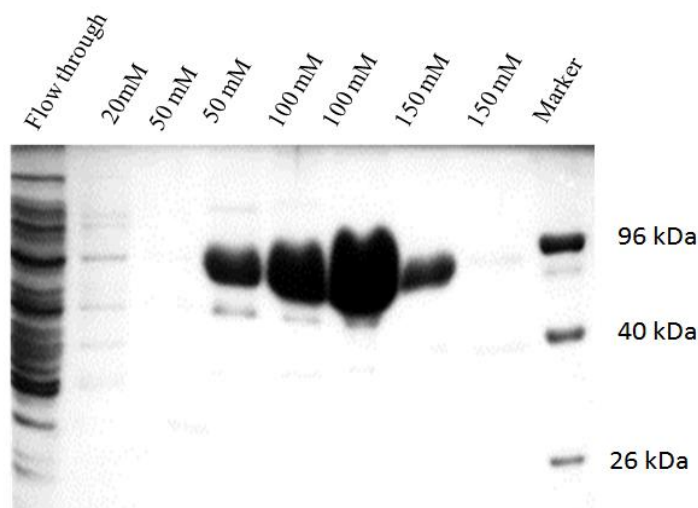


Рисунок 2 – Результаты хроматографической очистки белка А-МВР

Так как мальтозасвязывающий белок увеличивает молекулярную массу на 40,3 кДа, то расчетная молекулярная масса целевого белка составляет 77,3 кДа. Как видно из рисунка рекомбинантный белок А слитый с белком МВР в максимальном количестве элюировал с колонки при достижении концентрации имидазола до 100 мМ. Полученный результат свидетельствует о перспективности использования технологии получения рекомбинантного белка А путем добавления метки в виде мальтозсвязывающего белка.

Полученный гибридный белок будет использован в иммунохимических исследованиях.

### Список литературы

1. J.J. Langone. Protein A of *Staphylococcus aureus* and related immunoglobulin receptors produced by streptococci and pneumococci. *Adv Immunol.* 1982, 32, 157-252.
2. J. Sjodahl. Repetitive Sequences in Protein A from *Staphylococcus aureus* *Eur. J. Biochem.* 1977, 73, 343-351.
3. B. Guss., M Uhlén., B. Nilsson., M Lindberg., J Sjöquist., J Sjödahl. Region X, the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A. *Eur J Biochem.* 1984, Jan 16, 138, 13-20.
4. J. Hao., L. Xu., H. He., X. Du., L. Jia. High-level expression of Staphylococcal Protein A in *Pichia pastoris* and purification and characterization of the recombinant protein. *Protein Expr Purif.* 2013, 90,178-85.
5. S.Abeldenov, S.Kirillov, A.Kiribayeva, D.Silayev, B.Khassenov Expression and purification and biochemical characterization of recombinant phosphohydrolase appa in *Esherichia coli*. *Biotechnology. Theory and Practice*, 2014, no.3, pp. 61-65.
6. Laemml U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680-685.