

УДК 577.17;577.12.05.;57.08

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ОЧИСТКИ И РЕФОЛДИНГА РЕКОМБИНАНТНОГО ЭФРИНА-A5 ИЗ ТЕЛЕЦ ВКЛЮЧЕНИЯ *ESCHERICHIA COLI*

**А. В. ЖИДЕЦКИЙ¹⁾, М. В. ШОЛУХ¹⁾, Ю. Р. ХАННЕМАН²⁾, Р. ХАНДРИК²⁾,
Ж. В. МОТЫЛЕВИЧ³⁾, Ю.-П. ХИМАНЕН⁴⁾**

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

²⁾Биберахский университет прикладных наук, ул. Карлштрассе, 11, 888400, г. Биберах, Германия

³⁾Гродненский государственный медицинский университет, ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Беларусь

⁴⁾Институт исследования рака Sloan Kettering, 1275 Йорк авеню, 10065, г. Нью-Йорк, США

В результате настоящего исследования разработана методика выделения, очистки и рефолдинга рекомбинантного эфрина-A5 из телец включения *Escherichia coli*. В основу легли спектрофотометрические, электрофоретические, хроматографические методы, а также рефолдинг методом разведения и на матрице аффинного сорбента.

Образец цитирования:

Жидецкий А. В., Шолух М. В., Ханнеман Ю. Р., Хандрик Р., Мотылевич Ж. В., Химанен Ю.-П. Оптимизация условий очистки и рефолдинга рекомбинантного эфрина-A5 из телец включения *Escherichia coli* // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 2. С. 58–65.

For citation:

Zhydzetski A. V., Sholukh M. V., Hannemann J. R., Handrick R., Motylevich Z. V., Himanen J.-P. Optimizing purification and refolding conditions of the recombinant ephrin-A5 from inclusion bodies of *Escherichia coli*. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 2. P. 58–65 (in Russ.).

Авторы:

Александр Вячеславович Жидецкий – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории биохимии обмена веществ кафедры биохимии биологического факультета.

Михаил Васильевич Шолух – кандидат биологических наук, доцент; заведующий научно-исследовательской лабораторией биохимии обмена веществ кафедры биохимии биологического факультета.

Юрген Райнер Ханнеман – доктор философии, профессор; декан факультета биотехнологии.

Рене Хандрик – доктор философии; заведующий лабораторией факультета фармацевтической биотехнологии.

Жанна Витальевна Мотылевич – кандидат биологических наук; начальник отдела международных связей.

Юха-Пекка Химанен – доктор философии; ведущий научный сотрудник.

Authors:

Alexander Zhydzetski, junior researcher at the research laboratory of the biochemistry department, faculty of biology.

zhydzetski@gmail.com

Mikhail Sholukh, PhD (biology), docent; head of the research laboratory of the biochemistry of metabolism of the biochemistry department, faculty of biology.

msholukh@mail.ru

Jürgen Rainer Hannemann, PhD (philosophy), full professor; dean of the faculty of biotechnology.

hannemann@hochschule-bc.de

Rene Handrick, PhD (philosophy); head of the research laboratory, faculty of pharmaceutical biotechnology.

rene.handrick@gmx.de

Zhanna Motylevich, PhD (biology); head of the international relations department.

zhanna2012@gmail.com

Juha-Pekka Himanen, doctor of science (philosophy); leading researcher.

himanen@mskcc.org

Благодаря оптимизации условий отмывки и солюбилизации телец включения установлены составы отмывочных и солюбилизирующих растворов, позволяющие наиболее полно избавиться от примесных соединений с наименьшими потерями целевого белка, а также провести полную экстракцию целевого белка из растворенных телец включения. В процессе концентрирования и очистки рекомбинантного эфрина-А5 из солюбилизата телец включения с применением металл-хелатной хроматографии на Ni-сефарозе удалось получить целевой продукт чистотой $70,3 \pm 7,4$ % перед проведением рефолдинга. В результате скрининга основных характеристик рефолдинг-буфера для ренатурации рекомбинантного эфрина-А5 была выбрана следующая система: 20 ммоль/л трис-HCl; pH 8; 50 ммоль/л сахарозы; 2,5 ммоль/л DTT; 50 ммоль/л NaCl с конечной концентрацией эфрина-А5 в ренатурирующей системе до 20 мкг/мл и разведением в 10 раз.

Ключевые слова: эфрин-А5; скрининг условий рефолдинга; металл-хелатная хроматография; рекомбинантные белки; тельца включения.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ в рамках программы «Наука-М» № Б16М-082, ГПНИ «Фундаментальные и прикладные науки – медицине» (задание 1.11) и международного проекта BMBF (IB-037) «Развитие новых методов для анализа образцов гликозилирования моноклональных антител».

OPTIMIZING PURIFICATION AND REFOLDING CONDITIONS OF THE RECOMBINANT EPHRIN-A5 FROM INCLUSION BODIES OF *ESCHERICHIA COLI*

A. V. ZHYDZETSKI^a, M. V. SHOLUKH^a, J. R. HANNEMANN^b, R. HANDRICK^b,
Z. V. MOTYLEVICH^c, J.-P. HIMANEN^d

^aBelarusian State University, Niezaliežnasci Avenue, 4, 220030, Minsk, Belarus

^bBiberach University of Applied Sciences, Karlstrasse Street, 11, 88400, Biberach, Germany

^cGrodno State Medical University, Horkaha Street, 80, 230009, Grodno, Belarus

^dMemorial Sloan Kettering Cancer Center, 1275 York Avenue, 10065, New York, USA

Corresponding author: A. V. Zhydzetski (zhydzetski@gmail.com)

The paper is devoted to isolation, purification and development of refolding approach of the recombinant ephrin-A5 out of *Escherichia coli* inclusion bodies which corresponds to the aim of the research. The main methods applied are UV/visible spectroscopy, protein electrophoresis, column chromatography, refolding by dilution and matrix-assisted renaturation. Composition of the washing and solubilizing solutions was established as a result of washing and solubilizing conditions optimization allowing to get rid of impurities and minimize loss of the target protein as well as carry out the protein extraction out of inclusion bodies. The protein of interest with 70.3 ± 7.4 % purity was managed to obtain in conducting concentration and purification of the solubilized recombinant ephrin-A5 with the help of immobilized metal affinity chromatography on Ni-sepharose. Following refolding system containing 20 mmol/l Tris-HCl; pH 8; 50 mmol/l sucrose; 2.5 mmol/l DTT; 50 mmol/l NaCl with the final protein concentration up to 200 mkg/ml and 10-fold dilution was chosen as the best during the main refolding buffer characteristics screening.

Key words: ephrin-A5; refolding conditions screening; immobilized metal affinity chromatography; recombinant proteins; inclusion bodies.

Acknowledgments. The research was funded by BRFFI within the framework of the treaty No. Б16М-082, program СПСИ «Fundamental and applied science – medicine» (assignment 1.11) and international project BMBF (IB-037) «Development of new methods for analyzing specimens of monoclonal antibody glycosilation».

Эфриновые рецепторы (Eph) и их мембраносвязанные лиганды – эфрины (ephrin) активно синтезируются во время эмбрионального развития организма во многих тканях, участвуя в регуляции направления роста аксонов, образовании нейрональных связей, морфогенезе тканей, ангиогенезе и межклеточных взаимодействиях [1; 2]. Помимо функционирования в здоровых клетках и тканях эти белки играют важную роль в процессе канцерогенеза, участвуя в неоангиогенезе, метастазировании и инвазии опухолевых клеток [3; 4]. В связи с этим данная группа рецепторов и их лигандов представляет несомненный интерес в качестве объектов целевой терапии рака, а также при изучении патогенеза тканей [5]. Метод экспрессии рекомбинантных белков штаммами-продуцентами позволяет получить нужный белок в необходимых количествах, однако накопление химерного продукта в большинстве случаев происходит в виде телец включения (ТВ). Последние являются в основном неструктурированными агрегатами неактивного целевого продукта с включением белков и других балластных соединений клетки-продуцента [6]. Для растворения ТВ применяют высокие концентрации хаотропных агентов (мочевина, гуанидин гидрохлорид), солюбилизат которых используют для последующей очистки и рефолдинга целевого белка.

Цель настоящего исследования – разработка метода выделения, очистки и рефолдинга рекомбинантного эфрина-А5 из ТВ на основе скрининга главных параметров каждого этапа.

Методы исследования

Экспрессия рекомбинантного эфрина-А5. Для получения препаративного количества рекомбинантного эфрина-А5 использовали систему экспрессии на основе штамма *E. coli* BL21 (DE3) Codon RPL. Клетки после индукции экспрессии 1 ммоль/л изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) и дальнейшей ферментации (до достижения оптической плотности ≈ 1 при длине волны 600 нм) собирали путем центрифугирования 30 мин при 7000 g и 10 °C и замораживали при –20 °C на хранение. Перед использованием клетки размораживали при температуре 4 °C в течение ночи, после чего порционно переносили в лизис-буфер (50 ммоль/л трис-HCl; pH 8; 0,1 моль/л KCl; 5 ммоль/л CaCl₂; 10 ммоль/л MgCl₂ · 6H₂O; 1 ммоль/л PMSF; 10 % глицерола; 2 мкг/мл DNAase I; 10 000 ед./мл лизоцима) при механическом раздавливании и последующем ресуспендировании на магнитной мешалке до полного исчезновения видимых частиц в соотношении 1 г клеток на 3 мл среды. Полученную суспензию подвергали трехкратной обработке с помощью френч-пресса при 20 000 psi, после чего центрифугировали 30 мин при 13 300 g и 10 °C. После удаления супернатанта осадок, содержащий ТВ, взвешивали, аликвотировали и хранили при –20 °C. Наличие целевого белка определяли методом ДСН-электрофореза.

Отмывка телец включения. Отмывку ТВ от примесей проводили в два этапа. Сначала использовали растворы на основе 50 и 500 ммоль/л трис, 50 и 500 ммоль/л NaCl, 1 % изопропанола и 1 % Tween-20, затем – на основе 50 ммоль/л трис в 1–6 моль/л мочевины для определения наиболее эффективной системы. Тельца включения суспендировали в растворе для отмывки в соотношении 1 : 20 (вес/объем), перемешивали на магнитной мешалке в течение 1 ч и центрифугировали 20 мин при 15 000 g и 20 °C. Для сравнения эффективности систем отмывки белковый состав в осадке и супернатанте контролировали методом ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ).

Солюбилизация телец включения. Отмытые ТВ растворяли в буфере (50 ммоль/л трис-HCl, pH 8 или 9) с или без β-меркаптоэтанола (BME) и мочевины в концентрации 6 и 8 моль/л в течение ночи. После растворения ТВ полученный раствор центрифугировали 20 мин при 15 000 g и 20 °C. Наилучшую систему определяли по присутствию в солюбилизате мономерной формы белка.

Металл-хелатная хроматография (ИМАС) на Ni-сефарозе. Условия очистки подбирали на колонке с Ni-сефарозой FF объемом 1,5 мл. Колонку предварительно уравнивали буфером А (50 ммоль/л трис-HCl; pH 8; 8 моль/л мочевины; 0,5 моль/л NaCl; 5 ммоль/л имидазола, 5 ммоль/л BME), после чего наносили солюбилизат ТВ (7,5 мл) и промывали тем же буфером со ступенчатым градиентом концентрации имидазола (15 ммоль/л, 30, 60, 120, 240 ммоль/л, 1 моль/л) для определения содержания имидазола, позволяющего наиболее полно избавиться от примесных белков с наименьшей потерей целевого продукта.

Гель-фильтрационная хроматография. Избавление от имидазола в образцах белка после ИМАС и их перевод в буфер А осуществляли методом гель-фильтрации на сефадексе G-25. Полученный образец использовали для скрининга условий рефолдинга методом разведения.

Рефолдинг рекомбинантного эфрина-А5 методом разведения. Для определения условий рефолдинга эфрина-А5 использовали образец, полученный, как описано в предыдущем абзаце. На первом этапе применяли ренатурирующие системы с различными значениями pH на основе 0,4 моль/л сахарозы, 4 ммоль/л Цис (L-цистеин), 0,4 ммоль/л цистина, содержащие либо 20 ммоль/л MES (pH 5 и 6), либо 20 ммоль/л трис-HCl (pH 7–9) при температуре 10 или 20 °C. Затем подбирали окислительно-восстановительный потенциал ренатурирующего буфера. Для этого использовали различные концентрации дитиотреитола (DTT) (0,1; 1,0 и 5,0 ммоль/л) и пару цистеин – цистин с разным соотношением компонентов (0,1/0,1 ммоль/л; 1,0/0,1; 5,0/0,1; 0,1/1,0; 1,0/1,0; 5,0/1,0; 0,1/5,0; 1,0/5,0; 5,0/5,0 ммоль/л) на основе 20 ммоль/л трис-HCl; pH 8; 0,4 моль/л сахарозы. Далее устанавливали оптимальную конечную концентрацию белка и мочевины в растворе. Рефолдинг проводили в буфере (20 ммоль/л трис-HCl; pH 8; 0,4 моль/л сахарозы; 2,5 ммоль/л DTT) с разведением образца в 32, 16, 8 и 4 раза. На заключительном этапе определяли наилучшее антиагрегационное соединение и его концентрацию. В этом случае образец вносили в рефолдинг-буфер (20 ммоль/л трис; pH 8; 2,5 ммоль/л DTT), содержащий один из следующих компонентов: 0,1, 0,5, 1,0 % кремафора; 0,1, 0,5, 1,0 % полиэтиленгликоля 3000; 0,1, 0,5, 1,0 % поливинилпирролидона; 0,1, 0,2, 0,4 моль/л глицерола; 0,1, 0,2, 0,4 моль/л сахарозы; 0,1, 0,2, 0,4 моль/л L-глицина; 0,1, 0,2, 0,4 моль/л глюкозы.

Лучшей системой на каждом этапе рефолдинга считалась та, в которой после 12–14 ч инициации ренатурации детектировалась мономерная форма целевого белка и наблюдалась наименьшая степень мутности раствора, свидетельствующая об агрегации.

УФ-видимая спектроскопия. Концентрацию общего белка измеряли по методу Лоури в модификации Петерсона [7]. Агрегатное состояние белка оценивали по светорассеиванию при длине волны 340 нм через 30 мин и через 12 ч после инициации ренатурации. Степень экстракции эфрина-А5 и других примесных соединений при определении условий отмывки и солюбилизации ТВ выявляли спектрофотометрически в диапазоне длины волн от 200 до 600 нм.

ДСН-электрофорез в ПААГ. Эффективность экстракции рекомбинантного эфрина-А5 из ТВ, чистоту белковых фракций и содержание мономерной формы целевого белка оценивали методом ДСН-электрофореза в 12,5 % ПААГ [8]. Окраску гелей проводили красителем кумасси ярко-синим R-250 (CBV R-250) [9] либо серебром по [10]. Степень чистоты устанавливали с помощью программы TotalLab 2.01.

Результаты исследования и их обсуждение

Помимо целевого продукта ТВ содержат ряд примесных соединений (белки, нуклеиновые кислоты, компоненты клеточной стенки и мембраны), которые, как показано в ряде исследований, заметно снижают выход целевого продукта на этапе рефолдинга белка, оказывая при этом влияние и на чистоту конечного белка [11]. В большинстве случаев для этих целей применяют солевые растворы, детергенты и хаотропные агенты при щелочных значениях pH [12]. Концентрация данных соединений зависит в первую очередь от степени чистоты и связывания примесных соединений с ТВ, а также от штамма-продуцента, образующего эти включения.

Таким образом, на первом этапе был проведен скрининг условий отмывки ТВ, содержащих рекомбинантный эфрин-А5, растворами на основе NaCl, трис, Tween-20, изопропанола в различных концентрациях. По данным электрофореза в ПААГ (рис. 1) и УФ-видимой спектроскопии, установлено, что к наибольшей утрате примесных соединений приводит раствор, содержащий 0,5 моль/л NaCl, однако со значительными потерями целевого белка (см. рис. 1, 3). Отмывка ТВ раствором на основе 50–500 ммоль/л трис приводит к избавлению от примесных соединений небелковой природы, причем без потери целевого белка. Балластные соединения переходят в раствор непосредственно после добавления отмывочных систем, и их выход не зависит от продолжительности инкубации ТВ в данных растворах.

На втором этапе отмывки применяли растворы на основе мочевины, которая позволяет наиболее полно избавиться от прочно связанных с ТВ примесных белков. Чтобы установить содержание мочевины, удаляющей максимальное количество примесей и при этом не приводящей к потере целевого продукта, было изучено ее действие в концентрациях от 1 до 6 моль/л. Определено, что выход эфрина-А5 из ТВ начинается при концентрации мочевины 1 моль/л (см. рис. 1). При повышении концентрации до 3 моль/л и более происходит практически полная экстракция целевого продукта, достигающая максимума при 6 моль/л. По этой причине для отмывки ТВ была выбрана система только на основе 50 ммоль/л NaCl и 50 ммоль/л трис. Балластные соединения включали в себя, как правило, нуклеиновые кислоты, имеющие характерный максимум поглощения при длине волны 260 нм, и хромофорные

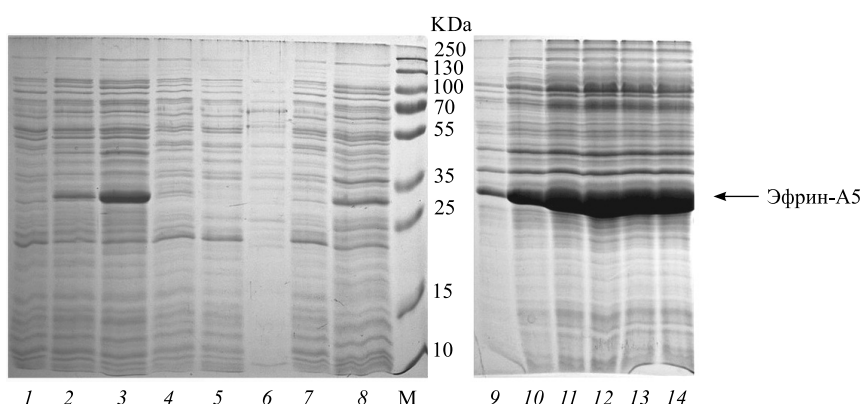


Рис. 1. Результаты определения условий отмывки телец включения эфрина-А5:

1 – H₂O; 2 – 0,05 моль/л NaCl; 3 – 0,5 моль/л NaCl; 4 – 0,05 моль/л трис; 5 – 0,5 моль/л трис; 6 – 1 % Tween-20; 7 – 1 % изопропанола; 8 – 0,5 моль/л NaCl + 0,5 моль/л трис + 1 % Tween-20 + 1 % изопропанола; М – маркеры молекулярных масс; 9 – 1 моль/л мочевины; 10 – 2 моль/л мочевины; 11 – 3 моль/л мочевины; 12 – 4 моль/л мочевины; 13 – 5 моль/л мочевины; 14 – 6 моль/л мочевины

Fig. 1. Washing conditions of ephrin-A5 inclusion bodies:

1 – H₂O; 2 – 0.05 mol/l NaCl; 3 – 0.5 mol/l NaCl; 4 – 0.05 mol/l Tris; 5 – 0.5 mol/l Tris; 6 – 1 % Tween-20; 7 – 1 % isopropanol; 8 – 0.5 mol/l NaCl + 0.5 mol/l Tris + 1 % Tween-20 + 1 % isopropanol; M – molecular weight markers; 9 – 1 mol/l urea; 10 – 2 mol/l urea; 11 – 3 mol/l urea; 12 – 4 mol/l urea; 13 – 5 mol/l urea; 14 – 6 mol/l urea

вещества, окрашивающие полученные растворы в желто-оранжевый цвет. При отмывке ТВ выбранной системой выход составляет до 80 % массы исходных телец.

На следующем этапе оптимизировали условия солюбилизации ТВ. С этой целью применяли системы на основе 6 и 8 моль/л мочевины при pH 8 и 9 с и без добавления ВМЕ. Установлено, что все подобные системы приводят к полному растворению ТВ, однако наибольшее количество мономерной формы целевого белка, по данным ДСН-электрофореза, наблюдалось в случае использования 6 и 8 моль/л мочевины при pH 8 и 9 с добавлением 10 ммоль/л ВМЕ. Данный агент необходим для восстановления меж- и внутримолекулярных дисульфидных связей, которые образуются в восстанавливающей среде клетки-хозяина [13]. В результате выбор был сделан в пользу следующей системы: 50 ммоль/л трис-HCl; pH 8; 8 моль/л мочевины; 5 ммоль/л ВМЕ и 0,5 моль/л NaCl.

Дальнейший этап заключался в определении оптимальных условий очистки целевого продукта из солюбилизата ТВ на колонке с Ni-сефарозой. Сорбент уравнивали буфером А (50 ммоль/л трис-HCl; pH 8; 8 моль/л мочевины; 5 ммоль/л ВМЕ; 0,5 моль/л NaCl) с добавлением имидазола до конечной концентрации 5 ммоль/л для минимизации связывания примесных белков, содержащих остатки гистидина. Затем наносили солюбилизат, промывали колонку тем же буфером А, после чего проводили ступенчатую элюцию.

На основании электрофоретических данных установлено, что для элюции примесных белков достаточно до 30 ммоль/л имидазола, а для полной элюции целевого белка требуется 1 моль/л этого агента (рис. 2).

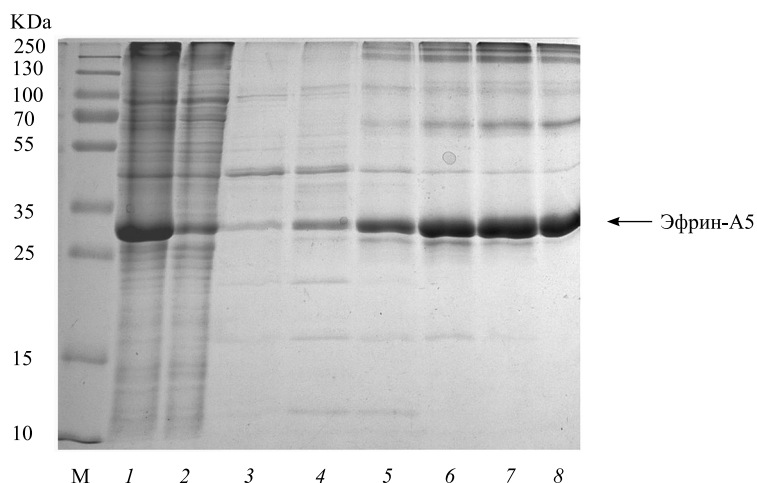


Рис. 2. Определение условий очистки рекомбинантного эфрина-A5 методом изократической элюции имидазолом:
М – маркеры молекулярных масс; 1 – солюбилизат ТВ; 2 – не связавшаяся с сорбентом фракция;
3 – элюция 15 ммоль/л имидазолом; 4 – элюция 30 ммоль/л имидазолом; 5 – элюция 60 ммоль/л имидазолом;
6 – элюция 120 ммоль/л имидазолом; 7 – элюция 240 ммоль/л имидазолом; 8 – элюция 1 моль/л имидазолом

Fig. 2. Determination of recombinant ephrin-A5 purification conditions by imidazole isocratic elution:
M – molecular weight marker; 1 – inclusion bodies solubilize; 2 – Ni-sepharose FF flowthrough;
3 – 15 mmol/l imidazole elution; 4 – 30 mmol/l imidazole elution; 5 – 60 mmol/l imidazole elution;
6 – 120 mmol/l imidazole elution; 7 – 240 mmol/l imidazole elution; 8 – 1 mol/l imidazole elution

В свою очередь, это приводит к необходимости удаления из образца имидазола и введения дополнительного этапа – гель-фильтрации, поскольку оказалось, что остатки имидазола после рефолдинга препятствуют связыванию рекомбинантного эфрина-A5 с Ni-сефарозой. Таким образом, после посадки целевого белка на Ni-сефарозу оптимальным условием его сбора и очистки является применение ступенчатой элюции: сначала буфером В1 (50 ммоль/л трис-HCl; pH 8; 8 моль/л мочевины; 5 ммоль/л ВМЕ; 0,5 моль/л NaCl; 25 ммоль/л имидазола), затем буфером В2 (50 ммоль/л трис-HCl; pH 8; 8 моль/л мочевины; 5 ммоль/л ВМЕ; 0,5 моль/л NaCl; 1 моль/л имидазола). После этого фракции элюции с целевым белком объединяли и наносили на колонку с сефадексом G-25 для избавления от имидазола. В результате удалось получить образец, свободный от имидазола, содержащий $70,3 \pm 7,4$ % целевого белка и готовый к дальнейшему проведению рефолдинга.

На следующем этапе были определены основные характеристики ренатурирующего буфера рефолдинга. Эффективность каждого параметра оценивали по электрофоретической чистоте мономерной формы и степени агрегации рекомбинантного эфрина-A5.

Исследование влияния температурного фактора и значения pH буфера для рефолдинга на выход мономерной формы целевого белка позволило установить, что при повышенных температурах (20 °C)

и значениях pH (5 и 6), близких к изоэлектрической точке белка (6,4), выход мономерной формы целевого продукта снижается. Это обусловлено в первую очередь элиминацией заряда молекулы и, как следствие, взаимодействием переходных белковых молекулярных форм посредством неспецифических гидрофобных связей, приводящих к инициации агрегации (рис. 3). Для проведения рефолдинга рекомбинантного эфрина-А5 было выбрано значение pH, равное 8, которое удалено от изоэлектрической точки молекулы, равной 6,4, и способствует формированию дисульфидных связей при температуре 10 °C [14].

На этапе выбора редокс-системы установлена зависимость выхода конечного продукта от природы и концентрации восстановительного агента. Так, при повышенных концентрациях (5 ммоль/л) DTT или

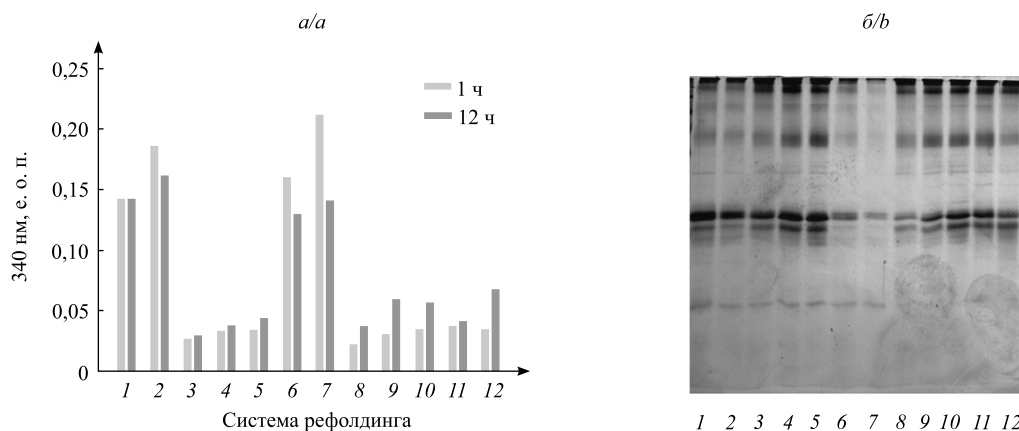


Рис. 3. Влияние pH и температуры рефолдинг-буфера на агрегацию эфрина-А5: а – турбидиметрический анализ эффективности систем рефолдинга; б – ДСН-электрофорез в 12,5 % ПААГ в нередуцирующих условиях систем рефолдинга первого этапа, окраска серебром.

Все системы включали в себя 0,4 моль/л сахарозы; 4 ммоль/л Цис; 0,4 ммоль/л цистина. Разведение в 8 раз. 1 – pH 5, 5 °C; 2 – pH 6, 5 °C; 3 – pH 7, 5 °C; 4 – pH 8, 5 °C; 5 – pH 9, 5 °C; 6 – pH 5, 20 °C; 7 – pH 6, 20 °C; 8 – pH 7, 20 °C; 9 – pH 8, 20 °C; 10 – pH 9, 20 °C; 11 – pH 7,4, 5 °C; 12 – pH 7,4, 20 °C

Fig. 3. Influence of refolding buffer pH and temperature value on ephrin-A5 aggregation: a – turbidimetric assay; b – 12.5 % non-reducing SDS-PAGE, Ag staining.

All systems contained 0.4 mol/l sucrose, 4 mmol/l Cys, 0.4 mmol/l cystine. 8-fold dilution. 1 – pH 5, 5 °C; 2 – pH 6, 5 °C; 3 – pH 7, 5 °C; 4 – pH 8, 5 °C; 5 – pH 9, 5 °C; 6 – pH 5, 20 °C; 7 – pH 6, 20 °C; 8 – pH 7, 20 °C; 9 – pH 8, 20 °C; 10 – pH 9, 20 °C; 11 – pH 7.4, 5 °C; 12 – pH 7.4, 20 °C

L-Цис наблюдались увеличение содержания мономерной формы эфрина-А5 и низкая степень агрегации, в то время как при возрастании концентрации L-цистина проявлялась обратная картина (результаты не представлены). В первом случае это связано с интенсивным окислением молекул DTT и, соответственно, восстановлением дисульфидных связей в молекуле белка, а также принятием ею нативной конформации, во втором – с восстановлением уже образовавшихся связей.

На степень и скорость агрегации при рефолдинге заметно влияет конечная концентрация белка в системе. В мировой практике рефолдинг проводят методом разведения, снижая концентрацию целевого продукта с 1–2 мг/мл до 1–10 мкг/мл в зависимости от типа белка и его склонности к агрегации [15]. Очевидно, что чем ниже концентрация белка, тем ниже степень агрегации, однако это приводит к значительным конечным объемам рефолдинг-буфера и существенному разведению образца, что, в свою очередь, увеличивает материальные и временные затраты. Поэтому необходимо подобрать такую концентрацию, при которой невысокими будут и степень агрегации, и требуемые объемы. Таким образом, следующий этап был посвящен определению оптимальной конечной концентрации эфрина-А5 в ренатурирующей системе. При достаточно большой конечной концентрации эфрина-А5 в растворе (300 мкг/мл) происходит значительное помутнение и образование агрегатов, хотя и в данном случае часть целевого белка присутствует в мономерной форме. На основании турбидиметрических и электрофоретических данных (результаты не представлены) при масштабировании процесса рефолдинга методом разведения было установлено, что оптимальными являются конечные концентрации мочевины 0,8 моль/л, белка – до 200 мкг/мл.

Немаловажную роль в обеспечении правильного протекания рефолдинга и подавления конкурирующего процесса – агрегации – играют стабилизаторы различной химической природы [16]. Нами изучено влияние кремафора, сахарозы, глицерола, полиэтиленгликоля 3000, поливинилпирролидона, L-глицина и глюкозы на процесс подавления агрегации. На основании результатов турбидиметрического исследования и ДСН-электрофореза установлено, что все исследуемые соединения препятствуют

агрегации в одинаковой степени и соответствуют применявшейся на первых этапах концентрации сахарозы 0,4 моль/л, как рекомендовано. Аналогичный эффект достигнут при концентрации сахарозы 50 ммоль/л. На ней, как самом дешевом и часто используемом в подобных процессах соединении, и был остановлен выбор.

На рис. 4 представлены данные, касающиеся оценки чистоты и гомогенности эфрина-А5 на стадиях от солюбилизации ТВ до сбора ренатурированного белка на конечном этапе.

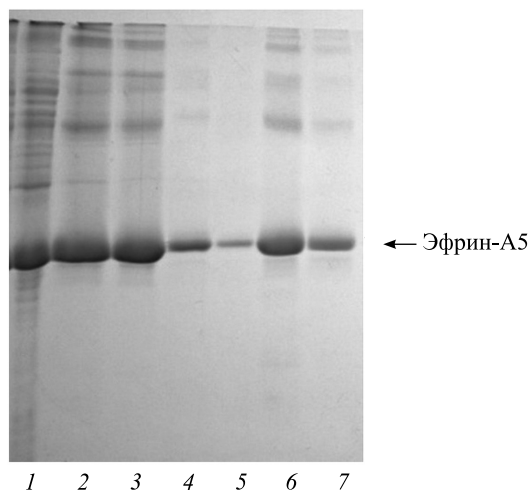


Рис. 4. Масштабирование процесса очистки и рефолдинга рекомбинантного эфрина-А5.
Эфрин-А5 на стадиях: 1 – солюбилизации ТВ; 2 – элюции с Ni-сефарозы; 3 – гель-фильтрации;
4 – в рефолдинг-буфере; 5 – проскока с IMAC; 6 – рефолдинга и элюции с Ni-сефарозы (фракция 1);
7 – рефолдинга и элюции с Ni-сефарозы (фракция 2).
ДСН-электрофорез в 12,5 % ПААГ, окраска CBV R-250

Fig. 4. Scaling up recombinant ephrin-A5 purification and refolding process.
Ephrin-A5: 1 – inclusion bodies solubilization; 2 – Ni-sepharose FF elution; 3 – gel-filtration;
4 – in refolding buffer; 5 – Ni-sepharose FF flowthrough;
6 – Ni-sepharose FF elution after refolding (fraction 1); 7 – Ni-sepharose FF elution after refolding (fraction 2).
12.5 % SDS-PAGE, CBV R-250 staining

Таким образом, в результате проверки эффективности действия различных композиций буфера для рефолдинга рекомбинантного эфрина-А5 выбрана следующая система: 20 ммоль/л трис-НСl; pH 8; 0,05 моль/л сахарозы; 2,5 ммоль/л DTT; 50 ммоль/л NaCl с конечной концентрацией эфрина-А5 до 200 мкг/мл.

В результате оптимизации условий отмывки и солюбилизации ТВ были установлены составы растворов, содержащие 50 ммоль/л NaCl; 50 ммоль/л трис и 50 ммоль/л трис-НСl; pH 8; 8 моль/л мочевины; 5 ммоль/л BME; 0,5 моль/л NaCl соответственно и позволяющие наиболее полно избавиться от примесных соединений небелковой природы (нуклеиновых кислот) с наименьшими потерями целевого белка, а также провести полную экстракцию целевого белка из растворенных ТВ. При концентрировании и очистке рекомбинантного эфрина-А5 из солюбилизата ТВ с применением металл-хелатной хроматографии на Ni-сефарозе удалось получить целевой продукт с чистотой $70,3 \pm 7,4$ % перед проведением рефолдинга. На основе скрининга главных характеристик рефолдинг-буфера для ренатурации рекомбинантного эфрина-А5 была выбрана следующая система: 20 ммоль/л трис-НСl; pH 8; 0,05 моль/л сахарозы; 2,5 ммоль/л DTT; 50 ммоль/л NaCl с конечной концентрацией эфрина-А5 в ренатурирующей системе до 200 мкг/мл и разведением в 10 раз.

Таким образом, на завершающем этапе данной методики удалось получить ренатурированный рекомбинантный эфрин-А5 в мономерной форме и гомогенном состоянии.

Библиографические ссылки

1. Charmsaz S., Boyd A. W. Expression and function of the Eph receptor family in leukemia and hematopoietic malignancies: prospects for targeted therapies // J. Leuk. 2013. Vol. 1, issue 1. P. 1–9.
2. Himanen J.-P., Nikolov D. Eph receptors and ephrins // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2003. Vol. 35, № 5. P. 130–134.
3. Pasquale E. B. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signaling and beyond // Nat. Rev. Cancer. 2010. Vol. 10, № 3. P. 165–180.

4. Janes P. W., Adikari S., Lackmann M. Eph/ephrin signalling and function in oncogenesis: lessons from embryonic development // *Curr. Cancer Drug Targets*. 2008. Vol. 8, issue 6. P. 473–479.
5. Zozulya S. A., Udovichenko I. P. Eph family receptors as therapeutic targets // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2012. Vol. 38, issue 3. P. 231–242.
6. Guise A. D., West S. M., Chaudhuri J. B. Protein folding *in vivo* and renaturation of recombinant proteins from inclusion bodies // *Mol. Biotechnol.* 1996. Vol. 6, issue 1. P. 53–64.
7. Peterson G. L. Determination of total protein // *Methods Enzymol.* 1983. № 91. P. 95–119.
8. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. № 227. P. 680–685.
9. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane // *Biochemistry*. 1971. Vol. 10, № 13. P. 2606–2617.
10. Damerval C., Le Guilloux M., Blaisonneau J., et al. A simplification of Heukeshoven and Dernick's silver staining of proteins // *Electrophoresis*. 1987. Vol. 8, issue 3. P. 158–159.
11. Georgiou G., Valax P. Isolating inclusion bodies from bacteria // *Methods Enzymol.* 1999. № 309. P. 48–58.
12. Lilie H., Schwarz E., Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli* // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1998. Vol. 9, issue 5. P. 497–501.
13. Misawa S., Kumagai I. Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies // *Biopolymers-Peptide Sci.* 1999. Vol. 51, issue 4. P. 297–307.
14. Tsumoto K., Ejima D., Kumagai I., et al. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies // *Protein Exp. Purif.* 2003. Vol. 28, issue 1. P. 1–8.
15. Vallejo L. F., Rinas U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins // *Microb. Cell Fact.* 2004. Vol. 3. P. 11–22.
16. Middelberg A. P. Preparative protein refolding // *Trends Biotechnol.* 2002. Vol. 20, issue 10. P. 437–443.

References

1. Charmsaz S., Boyd A. W. Expression and function of the Eph receptor family in leukemia and hematopoietic malignancies: prospects for targeted therapies. *J. Leuk.* 2013. Vol. 1, issue 1. P. 1–9. DOI: 10.4172/2329-6917.1000107.
2. Himanen J.-P., Nikolov D. Eph receptors and ephrins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2003. Vol. 35, No. 5. P. 130–134. DOI: 10.1038/nrc2806.
3. Pasquale E. B. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signaling and beyond. *Nat. Rev. Cancer.* 2010. Vol. 10, No. 3. P. 165–180.
4. Janes P. W., Adikari S., Lackmann M. Eph/ephrin signalling and function in oncogenesis: lessons from embryonic development. *Curr. Cancer Drug Targets*. 2008. Vol. 8, issue 6. P. 473–479. DOI: 10.2174/156800908785699315.
5. Zozulya S. A., Udovichenko I. P. Eph family receptors as therapeutic targets. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2012. Vol. 38, issue 3. P. 231–242. DOI: 10.1134/S106816201203017X.
6. Guise A. D., West S. M., Chaudhuri J. B. Protein folding *in vivo* and renaturation of recombinant proteins from inclusion bodies. *Mol. Biotechnol.* 1996. Vol. 6, issue 1. P. 53–64. DOI: 10.1007/BF02762323.
7. Peterson G. L. Determination of total protein. *Methods Enzymol.* 1983. No. 91. P. 95–119.
8. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970. No. 227. P. 680–685.
9. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*. 1971. Vol. 10, No. 13. P. 2606–2617. DOI: 10.1021/bi00789a030.
10. Damerval C., Le Guilloux M., Blaisonneau J., et al. A simplification of Heukeshoven and Dernick's silver staining of proteins. *Electrophoresis*. 1987. Vol. 8, issue 3. P. 158–159. DOI: 10.1002/elps.1150080308.
11. Georgiou G., Valax P. Isolating inclusion bodies from bacteria. *Methods Enzymol.* 1999. No. 309. P. 48–58.
12. Lilie H., Schwarz E., Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1998. Vol. 9, issue 5. P. 497–501.
13. Misawa S., Kumagai I. Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biopolymers-Peptide Sci.* 1999. Vol. 51, issue 4. P. 297–307. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0282(1999)51:4<297::AID-BIP5>3.0.CO;2-I.
14. Tsumoto K., Ejima D., Kumagai I., et al. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Exp. Purif.* 2003. Vol. 28, issue 1. P. 1–8.
15. Vallejo L. F., Rinas U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb. Cell Fact.* 2004. Vol. 3. P. 11–22. DOI: 10.1186/1475-2859-3-11.
16. Middelberg A. P. Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol.* 2002. Vol. 20, issue 10. P. 437–443.

Статья поступила в редколлегию 15.05.2017.
Received by editorial board 15.05.2017.