



УДК 577.112.083:577.15

РАЗРАБОТКА ПИЛОТНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЛЕГКОЙ ЦЕПИ ЭНТЕРОПЕПТИДАЗЫ ЧЕЛОВЕКА В РАСТВОРИМОЙ И ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ФОРМАХ

© 2020 г. Д. А. Макаров*,*, А. А. Зинченко*, В. Н. Степаненко*, Д. С. Калинин*, **, Т. Д. Мелихова*, Е. А. Нокель*, М. Э. Гаспарян*, И. В. Мягих*, Д. А. Долгих*, **

*ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

**ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1

Поступила в редакцию 27.02.2020 г.

После доработки 17.03.2020 г.

Принята к публикации 22.03.2020 г.

Энтеропептидаза, протеолитический фермент ЕС 3.4.21.9, представляет собой гликопротеин, состоящий из двух тяжелых и легких полипептидных цепей. Легкая цепь фермента представляет собой сериновую протеиназу, рекомбинантные варианты которой применяются в биотехнологии для расщепления пептидных связей в гибридных белках после специфического сайта узнавания DDDDK- или DDDDR-. Мы разработали пилотный способ получения рекомбинантной легкой цепи энтеропептидазы человека, содержащей каскад из двух аффинных меток. Сконструированный экспрессионный плазмидный вектор рL-НЕР-Н6-СВД, кодирующий гибридный белок, содержащий последовательность легкой цепи энтеропептидазы человека, металлсвязывающий и хитин-связывающий домены был трансформирован в штамм *Escherichia coli* BL21(DE3) и после экспрессии гибридного белка НЕР-Н6-СВД была разработана относительно простая схема ренатурации и очистки фермента. После иммобилизации очищенного препарата на хитиновый носитель фермент сохранял активность специфического расщепления субстратов в течении как минимум 6 циклов.

Ключевые слова: рекомбинантный белок, энтеропептидаза, иммобилизованный фермент

DOI: 10.31857/S0132342320050140

ВВЕДЕНИЕ

Простота выделения, очистки и идентификации многих рекомбинантных белков часто достигается путем создания гибридных конструкций, включающих дополнительные аффинные пептидные метки [1]. Удаление аффинной метки может быть осуществлено ферментативным расщеплением гибридного белка, однако в промышленности использование подобного подхода часто ограничивается высокой стоимостью ферментных препара-

тов. В связи с этим, создание удобных в работе гибридных конструкций рекомбинантных ферментов с приемлемой активностью, пригодных для использования в промышленных процессах получения белковых препаратов различного назначения, а также разработка недорогих технологических процессов выделения и очистки таких ферментных препаратов является актуальной задачей. В число наиболее широко используемых в биотехнологии рекомбинантных протеолитических ферментов входит легкая цепь энтеропептидазы человека [2].

Энтеропептидаза (ЕС 3.4.21.9) является высокоспецифичной протеиназой и играет ключевую роль в пищеварении позвоночных [3]. В начале каскада активации ферментов пищеварения энтеропептидаза с высокой эффективностью катализирует гидролиз трипсиногена строго по остатку лизина в специфическом сайте узнавания -DDDDK-I-, высвобождая трипсин, который далее активировывает целый ряд панкреатических зимогенов [4, 5].

Список сокращений: мГБ-1 – модельный гибридный белок-1 (Тгх-интерферон альфа-2b); мГБ-2 – модельный гибридный белок-2 (Тгх-пуротоксин-6); L-НЕР – легкая цепь энтеропептидазы человека; t-L-НЕР – легкая цепь энтеропептидазы человека L-НЕР – Н6 – СВД, содержащая каскад из двух аффинных меток; i-t-L-НЕР – иммобилизованный вариант легкой цепи энтеропептидазы человека L-НЕР – Н6 – СВД, содержащей каскад из двух аффинных меток; СВД – хитин-связывающий домен, Н6 – полигистидиновый домен; ГБ – гибридный белок; ТВ – тельца включения; STI – ингибитор трипсина сои.

Автор для связи: (тел.: +7 (985) 699-77-47; эл. почта: young-chemist@mail.ru).

Нативная энтеропептидаза представляет собой дисульфид-связанный гетеродимер, состоящий из “тяжелой” и “легкой” цепей с молекулярной массой ~120 и ~26 кДа соответственно [3]. Легкая цепь энтеропептидазы, каталитический домен фермента, является сериновой эндопептидазой трипсинового типа [6] и содержит четыре дисульфидных мостика, которые важны для функционирования и стабильности молекулы фермента [7].

Описано несколько способов получения энтеропептидазы из природных источников [8, 9]. Однако в биотехнологических целях чаще используют рекомбинантную легкую цепь энтеропептидазы [10, 11].

В исследовании Ла-Валли показана возможность клонирования и функциональной экспрессии легкой цепи бычьей энтеропептидазы в клетках млекопитающих COS-1 [12]. Легкая цепь энтеропептидазы была успешно экспрессирована в разнообразных биологических системах, таких как *Aspergillus niger* [13] и *Saccharomyces cerevisiae* [14]. Также были опубликованы многочисленные работы по экспрессии легкой цепи энтеропептидазы в *Pichia pastoris* [15]. Кроме того, легкая цепь энтеропептидазы может быть получена даже в клетках насекомых [16].

Наиболее предпочтительной системой для экспрессии легкой цепи энтеропептидазы является бактерия *E. coli*, поскольку получаемый белок продуцируется в большом количестве за короткий срок. Однако исследователи сталкивались с тем, что энтеропептидаза продуцировалась в нерастворимой форме. До сегодняшнего дня было опубликовано несколько исследований, посвященных повышению растворимости и изучению фолдинга рекомбинантной легкой цепи энтеропептидазы [17–20].

В настоящей работе описана оригинальная, эффективная, легко масштабируемая технология получения рекомбинантного гибридного белка t-L-HEP содержащего хитин-связывающий домен на С-конце, что позволило иммобилизовать фермент на хитиновый сорбент и использовать многократно для расщепления слитных белков медицинского назначения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка пилотной технологии получения рекомбинантного белка L-HEP

В лаборатории инженерии белка ИБХ РАН под руководством академика М.П. Кирпичникова ранее была разработана методика получения рекомбинантной легкой цепи энтеропептидазы человека (регистрационный номер GenBank U09860) [11, 17] и создан штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3)/pET-32a/L-HEP гибридного белка Trx-DDDDK-L-

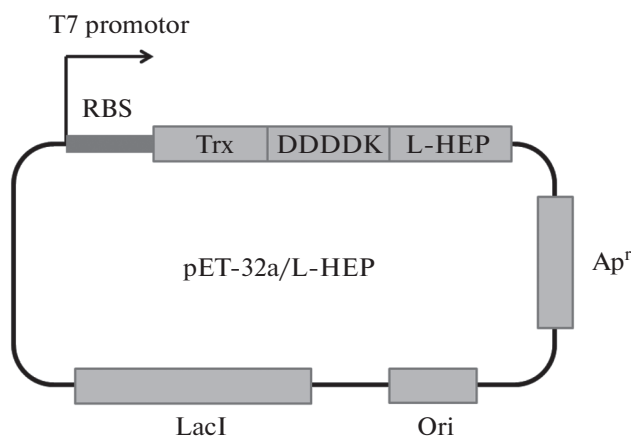


Рис. 1. Физическая карта плазмиды pET-32a/L-HEP. ori – ориджин репликации, AmpR – ген резистентности к ампициллину, lacI – ген репрессора лактозного оперона, T7 promoter – промотор бактериофага T7, RBS – сайт связывания с рибосомой, Trx-DDDDK-L-HEP – ген, кодирующий гибридный белок, состоящий из тиоредоксина, сайта узнавания легкой цепи энтеропептидазы человека и непосредственно легкой цепи энтеропептидазы человека.

HEP, содержащего аминокислотную последовательность тиоредоксина (Trx), специфического сайта узнавания энтеропептидазы (DDDDK-) и легкой цепи энтеропептидазы человека (L-HEP) (рис. 1).

Особенность данной конструкции заключалась в том, что ГБ после ренатурации автокаталитически расщеплялся с высвобождением свободной L-HEP и белка-партнера.

Лабораторная методика позволяла получить 10 мг высокоочищенной активной L-HEP с 1 л клеточной культуры после двух циклов ренатурации [11, 17]. Для наработки рекомбинантной L-HEP в количествах, достаточных для производственных целей, требовалось масштабировать и оптимизировать процесс получения фермента. Наличие в лабораторной методике нескольких стадий диализа и использование дорогостоящего аффинного сорбента (STI-агароза) осложняло масштабирование процесса. Поэтому была проведена оптимизация технологии получения L-HEP.

Переход от культивирования штамма-продуцента в качалочных колбах на промышленный ферментер объемом 200 л увеличил средний выход влажной биомассы до 40 г с 1 л культуральной среды. Экспрессия гибридного белка при этом достигала 30% от общего белка клетки.

Тельца включения, полученные после разрушения биомассы, отмывали буферными растворами, содержащими мочевины и/или тритон X-100, как описано в Экспериментальной части. Отмытые ТВ растворяли в денатурирующих условиях, используя буферный раствор 50 мМ Трис,

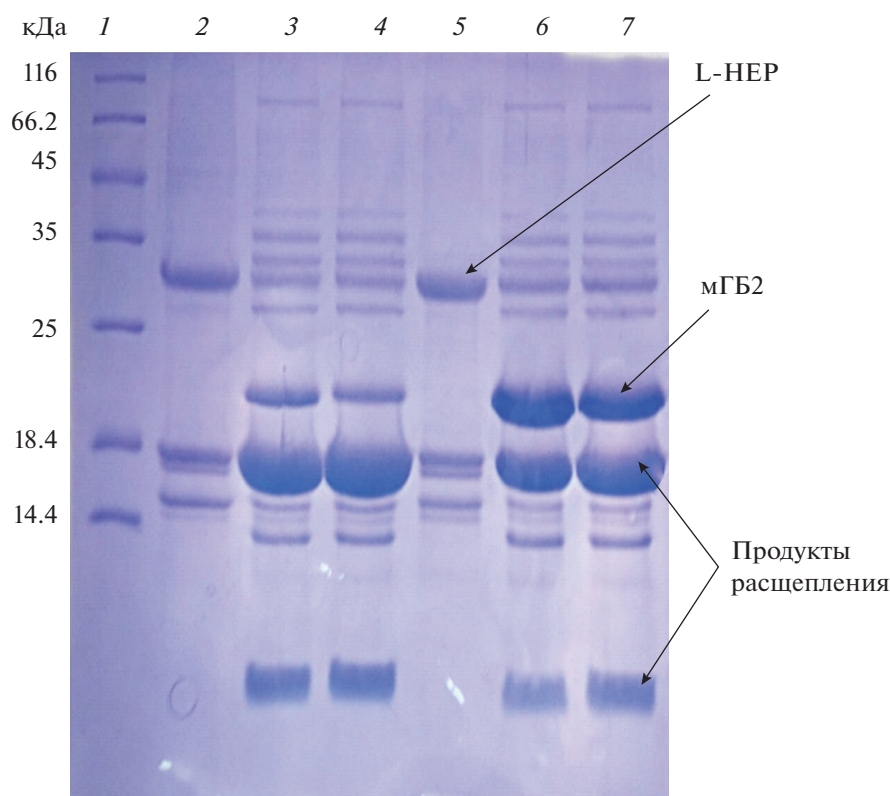


Рис. 2. Электрофореграмма расщепления модельного гибридного белка 2 с помощью L-NEP: 1 – стандарт молекулярных масс, 2 – ренатурат легкой цепи энтеропептидазы человека с добавкой 20% глицерина, 3–4 – расщепление мГБ-2, 25°C в течение 8 и 16 ч соответственно, в массовом соотношении 1 : 50, 5 – ренатурат легкой цепи энтеропептидазы человека с добавкой 1 мМ цистеина, 6–7 – расщепление мГБ-2, 25°C в течение 8 и 16 ч соответственно, в массовом соотношении 1 : 50.

6 М мочевины, рН 10. Ренатурацию осуществляли методом разбавления растворенных ТВ до постоянной концентрации гибридного белка 0.7 мг/мл в соответствующих буферных растворах.

Оптимизация стадии ренатурации включала исследование влияния ряда факторов на эффективность процесса. В процессе исследований варьировали состав и рН буферных растворов, температуру проведения процесса, время реакции, а также изучали влияние на ход ренатурации различных химических реагентов (NaCl, ЭДТА, аргинина, глицерина, цистеина, сорбитола и др.).

Наиболее удачными для ренатурации ГБ оказались буферные растворы, в состав которых входили 20% глицерин или 1 мМ цистеин. Остальные исследованные реагенты не оказывали положительного эффекта на течение процесса (данные не приведены). В правильно подобранных условиях ренатурации наблюдалось автокаталитическое отщепление энтеропептидазы с высвобождением L-NEP.

Активность фермента в ренатуратах оценивали электрофоретически по степени расщепления мГБ-1 и/или мГБ-2 (рис. 2, 3, 4). По результатам

исследований было установлено, что наиболее эффективная ренатурация, и, как следствие, более глубокое расщепление модельных гибридных белков образующейся энтеропептидазой, наблюдалась в буферном растворе, содержащем 20% глицерин.

Для оценки количества активного фермента в ренатурате, содержащем 20% глицерин, препарат очистили на сорбенте STI-Sepharose (сефароза, конъюгированная с ингибитором трипсина сои). Аффинная хроматография использовалась только для контроля процесса ренатурации и не применялась в технологическом процессе. Аликвоту ренатурата пропускали через аффинный сорбент и определяли количество связавшейся L-NEP по отношению к общему количеству фермента. В результате оказалось, что на сорбенте связалось около 2% фермента от общей массы L-NEP, что составило 0.02 мг активного фермента в 1 мг L-NEP. Таким образом, в ходе разработанной технологии ренатурации был достигнут такой же выход активного фермента, как и в методике лабораторной технологии [11], но с меньшими трудозатратами и сокращением времени производства.

Подбор условий расщепления модельных гибридных белков и определение активности полученной легкой цепи энтеропептидазы человека привел к следующим результатам: расщепление мГБ-1 прошло более чем на 85% в течение 30 минут при температуре 25°C и массовом соотношении фермент субстрат 1 : 100 (массовое соотношение с учетом активной L-HEP составило 1 : 5000), или в течение 60 мин при массовом соотношении фермент—субстрат 1 : 200 (массовое соотношение с учетом активной L-HEP составило 1 : 10000). Расщепление мГБ-2 прошло более чем на 85% в течение 24 часов при температуре 25°C и массовом соотношении фермент/субстрат 1 : 50 (массовое соотношение с учетом активной L-HEP составило 1 : 2500). На основе полученных результатов была разработана опытно-промышленная технология получения легкой цепи энтеропептидазы человека и наработана партия ферментного препарата. Выход активного фермента составил 100 мг с 1 л культуральной жидкости. Полученный препарат был успешно использован при получении инновационного анальгетика Пуротоксин-6 и Интерферона альфа-2b.

Разработка технологии получения рекомбинантного гибридного белка t-L-HEP

При использовании ферментных препаратов для получения рекомбинантных белков различного назначения часто возникают проблемы, связанные с необходимостью удаления фермента из реакционной смеси, например, для остановки ферментативной реакции, очистки целевого продукта от следовых количеств фермента и т.д. Для этого в структуру целевого белка вводят аффинные метки, позволяющие существенно облегчить такие процедуры [20, 21]. Для решения подобных задач мы создали новую генно-инженерную конструкцию гибридной L-HEP, содержащую в своей структуре пептидные аффинные метки, позволяющие количественно удалять фермент из любой смеси и на любой стадии получения, выделения и очистки белков.

Для этого был сконструирован экспрессионный плазмидный вектор pL-HEP-H6-CBD, кодирующий гибридный белок, содержащий аминокислотную последовательность легкой цепи энтеропептидазы человека, в N-концевой части которой расположен специфический сайт узнавания L-HEP, DDDDK-, а в C-концевой — полигистидиновая последовательность (H6 и хитинсвязывающий домен (CBD) (рис. 5).

Экспрессионный вектор был трансформирован в *E. coli* BL21(DE3). В первичной структуре L-HEP содержатся остатки цистеина (которые образуют четыре дисульфидные связи), что значительно затрудняет правильный фолдинг экспрессированного белка [20]. В полученном штамме-

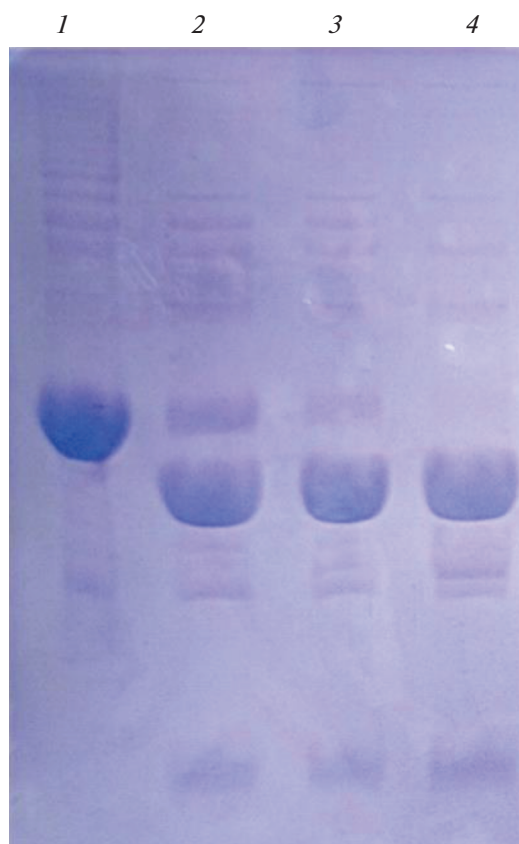


Рис. 3. Электрофореграмма кинетики расщепления модельного гибридного белка 2 ферментом L-HEP. Массовое соотношение 1 : 50: 1 – мГБ-2, 2 – расщепление энтеропептидазой 8 ч, 3 – расщепление энтеропептидазой 16 ч, 4 – расщепление энтеропептидазой 24 ч.

продуценте *E. coli* BL21(DE3)/pL-HEP-H6-CBD был зафиксирован высокий уровень экспрессии ГБ N-seq – DDDDK – L-HEP – H6 – CBD – 40 г влажной биомассы с 1 л культуры. После индукции большая часть ГБ (~95%) формировала тельца включения. Отмывка, экстракция и ренатурация новой гибридной конструкции проводилась по схеме, отработанной для получения L-HEP.

Оптимизация стадии очистки t-L-HEP

Для очистки t-L-HEP использовали металлхелатную аффинную хроматографию. Обессоливание элюата после аффинной хроматографии проводили с помощью гель-фильтрации. Хроматографическая чистота полученной t-L-HEP составила более 80% (рис. 6).

Таким образом, была создана пилотная технология получения ферментного препарата t-L-HEP. Эффективность ренатурации сохранилась и осталась соответствующей лабораторным результатам, полученным для L-HEP [17]. Однако оптимиза-

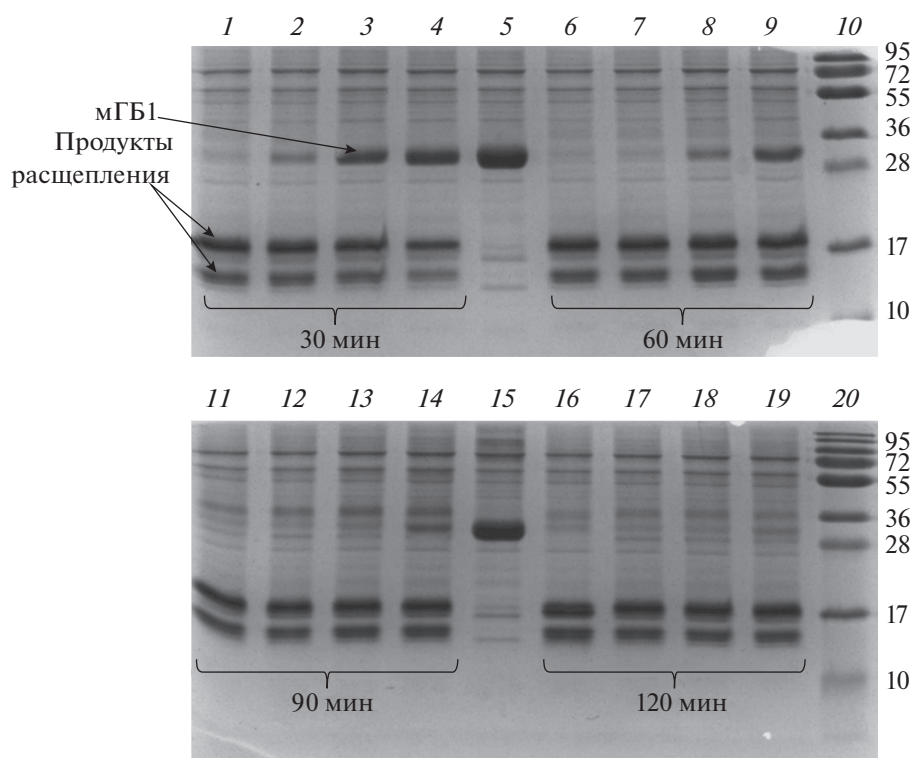


Рис. 4. Электрофореграмма кинетики расщепления модельного гибридного белка 1 ферментом L-NEP. Расщепление мГБ-1 с L-NEP в массовом соотношении фермент : субстрат 1 : 50; 1 : 100; 1 : 200; 1 : 400 (массовое соотношение с учетом активной L-NEP 1 : 2500; 1 : 5000; 1 : 10000; 1 : 20000), соответственно, за 30 мин (дорожки 1–4), за 60 мин (дорожки 6–9), за 90 мин (дорожки 11–14) и за 120 мин (дорожки 16–19). Дорожки 5 и 15 представляют белок мГБ-1 до расщепления. Дорожки 10 и 20 – маркеры молекулярных масс.

ция процесса и масштабирование лабораторной методики, позволили получить значительные количества ферментного препарата. Невысокий выход на стадии ренатурации компенсируется простотой и хорошей воспроизводимостью технологии выделения и очистки t-L-NEP. Выход активного гибридного фермента t-L-NEP (L-NEP – H6 – CBD) составил 65.2 мг с 1 л культуральной жидкости.

Иммобилизация t-L-NEP на хитиновой смоле

Иммобилизация ферментов является одним из возможных вариантов решения проблемы снижения материальных издержек при производстве рекомбинантных белков различного назначения. Такая возможность была предусмотрена нами в структуре гибридного белка t-L-NEP, содержащей аминокислотную последовательность хитин-связывающего домена – CBD. Иммобилизацию t-L-NEP осуществляли на хитиновой смоле (рис. 7), условия иммобилизации приведены в Экспериментальной части. Емкость сорбента по белку составила 1 мг/мл.

Активность i-t-L-NEP определяли по расщеплению мГБ-1. Через 0.5 мл сорбента с иммобилизованным ферментом (i-t-L-NEP) пропускали 10 мл

раствора мГБ-1 (3 мг/мл). В ходе эксперимента время контакта субстрата с i-t-L-NEP контролировали скоростью потока через сорбент (от 0.5 до 4 мл/мин). В результате установлено, что 12 секунд контакта мГБ-1 с i-t-L-NEP (0.5 мг в объеме 0.5 мл) достаточно для количественного расщепления мГБ-1, данное время соответствует скорости потока 2.5 мл/мин. Была определена стабильность иммобилизованного фермента. Показано вплоть до 3 цикла отсутствие снижения ферментативной активности i-t-L-NEP, при этом активность иммобилизованного фермента после шестого цикла снизилась не более чем на 10%, что позволит использовать фермент многократно (рис. 8). При скоростях потока больше 2.5 мл/мин происходила деформация сорбента и десорбция иммобилизованного фермента. Это свидетельствует о невысокой операционной стабильности препарата иммобилизованного фермента, что может ограничить возможности его использования.

Таким образом, в результате проведенных исследований создана новая структура гибридного белка t-L-NEP (L-NEP – H6 – CBD) способного расщеплять белки по специфическому сайту энтеропептидазы, разработан эффективный биотехнологический способ получения двух вариан-

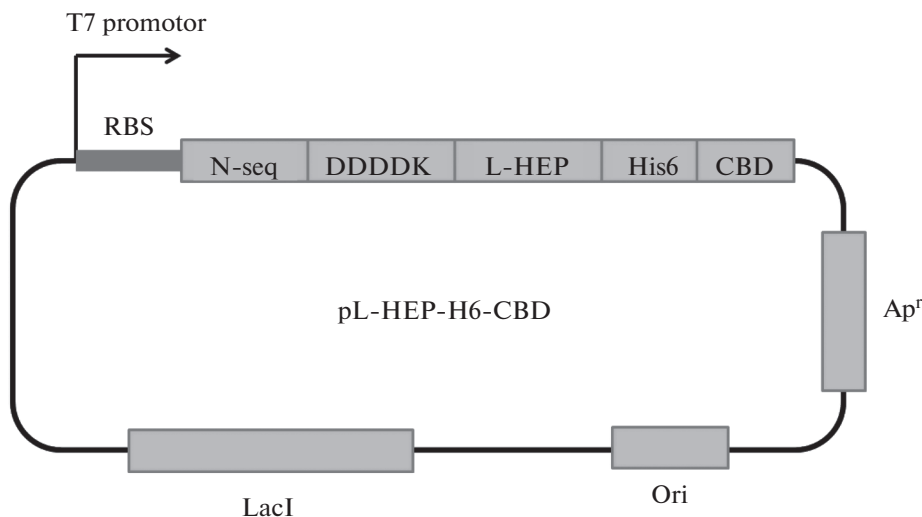


Рис. 5. Физическая карта плазмиды pL-HEP-H6-CBD. ori – ориджин репликации, Ap^r – ген резистентности к ампициллину, lacI – ген репрессора лактозного оперона, T7 promoter – промотор бактериофага T7, RBS – сайт связывания с рибосомой, N-seq – DDDDK-L-HEP-H6-CBD – нуклеотидная последовательность, кодирующая гибридный белок, включающий аминокислотные последовательности специфического сайта узнавания энтеропептидазы, легкой цепи энтеропептидазы человека, гексагистидинового домена и хитин-связывающего домена.

тов рекомбинантной легкой цепи энтеропептидазы человека, L-HEP и t-L-HEP, содержащей каскад из двух аффинных меток, осуществлена иммобилизация ферментного препарата t-L-HEP. Показано сохранение активности иммобилизованного фермента в течение 6 циклов. Обнаружены особенности функционирования i-t-L-HEP, связанные с механическими свойствами носителя. В дальнейшем планируется оптимизация условий использования иммобилизованных ферментов на хитиновых носителях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

В исследовании использовали следующие реактивы: натрия хлорид (Panreac, Испания), едкий натр (Panreac, Испания), дрожжевой экстракт (Sigma-Aldrich, США), этанол (Panreac, Испания), ледяную уксусную кислоту (Panreac, Испания) мочевины (Sigma-Aldrich, США); акриламид (Panreac, Испания), Трис (трис(гидроксиметил)аминометан) (Panreac, Испания) акриламид/бисакриламид 29/1 (Sigma Aldrich, США), персульфат аммония (Merck), бромфеноловый синий (BioRad, США); Кумасси R 250 (BioRad, США), хлороводородную кислоту (Panreac, Испания), дитиотреитол (DTT) (Sigma-Aldrich, США), додецилсульфат натрия SDS (Sigma-Aldrich, США), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (Sigma-Aldrich, США), ампициллин (Sigma-Aldrich, США), бактотриптон (Sigma-Aldrich, США), N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED), молекулярный

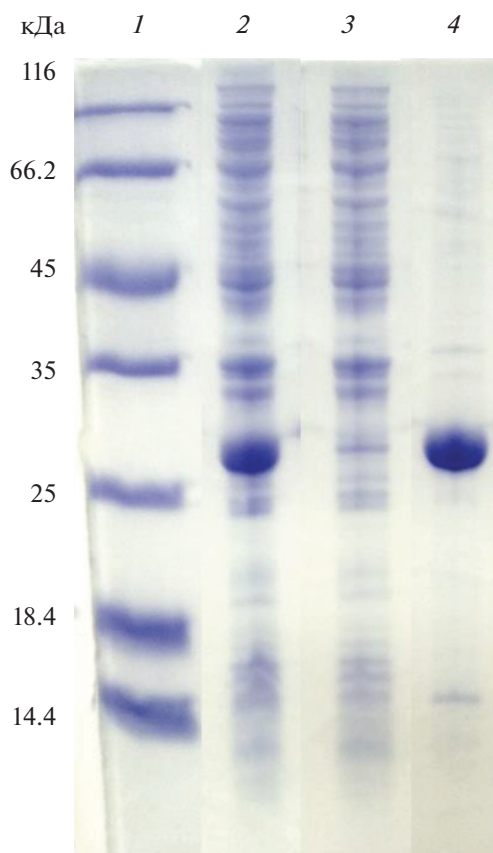


Рис. 6. Электрофореграмма белковых фракций при очистке t-L-HEP с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии: 1 – маркеры молекулярных масс, 2 – исходное нанесение, 3 – элюат примесных белков, 4 – элюат t-L-HEP.

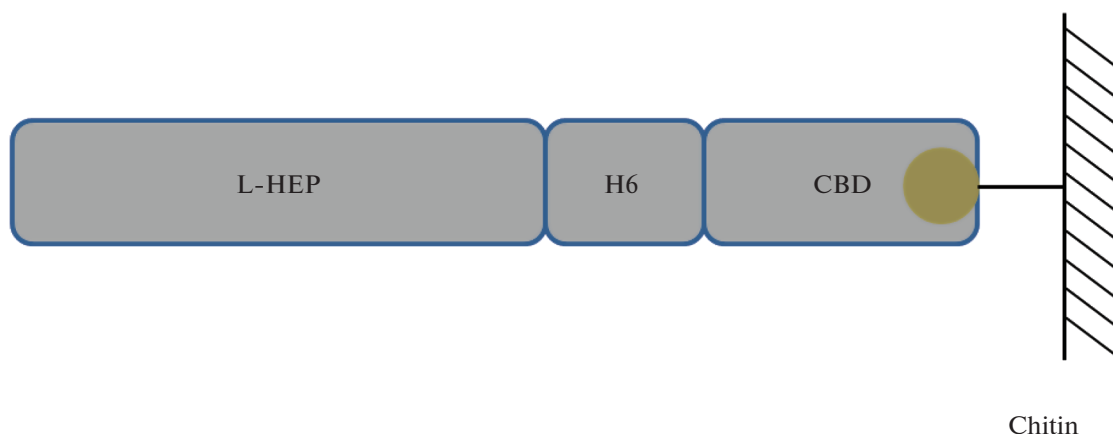


Рис. 7. Схематическое изображение иммобилизованного фермента i-t-L-HEP.

маркер Unstained Protein Molecular Weight Marker #26610 (“Thermo Fisher Scientific”, США). Среда LB [23].

В исследовании использовался штамм *E. coli* BL21(DE3) генотип: *E. coli* str. BF– ompTgaldcmlonhdsB(rB–mB–) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+] K-12 (λS).

В работе использовали хитиновый сорбент производства NEB (Англия). Емкость сорбента – 2 мг мальтоза-связывающего белка/мл сорбента, размер частиц 50–60 микрон.

Все генно-инженерные конструкции выполнены по аутсорсингу в компании ЗАО Евроген (Россия).

Модельные гибридные белки, мГБ-1 и мГБ-2, получены на Опытном биотехнологическом производстве ИБХ РАН с использованием технологии рекомбинантной ДНК и экспрессией в *E. coli*.

Создание штамма продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pL-HEP-H6-CBD (pET-32a/L-HEP)

Плазмидами pL-HEP-H6-CBD или pET-32a/L-HEP трансформировали компетентные клетки (*E. coli* штамм BL21(DE3)). Трансформанты высевали на агаризованную среду с ампицилином и инкубировали в течение 20 ч при 37°C. Выросшие колонии с помощью петли в стерильных условиях переносили в питательную среду LB с ампицилином объемом 4 мл и культивировали в течение 16 часов при 37°C. Полученной ночной культурой засеивали 6 мл питательной среды LB, содержащей ампициллин в концентрации 100 мкг/мл, и инкубировали на инкубаторе-шейкере INNOVA 40R (New Brunswick, США), при 37°C 200 об./мин. до значений оптической плотности культуры 0.9 опт. ед. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре ПЭ-5300ВИ (Экохим, Россия) при длине волны 600 нм, используя в качестве

контроля питательную среду. Затем производили индукцию биосинтеза целевого ГБ добавлением 1000 кратного раствора изопропил-β-D-тиогактопиранозиды (ИПТГ) до конечной концентрации 0.22 ммоль/л, после чего культуру инкубировали в течение 4 часов при 37°C. По окончании культивирования осадок отделяли путем центрифугирования на центрифуге 260D (DENVILL, США) 14000 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Клеточный лизат анализировали на наличие целевого гибридного белка с помощью электрофореза по Лэммли [23]. По результатам анализа был выбран клон с наибольшим уровнем экспрессии целевого гена. Суспензию клеток замораживали при –72°C с добавлением глицерина до конечной концентрации 15%.

Выращивание инокулята штамма *E. coli* BL21(DE3)/pL-HEP-H6-CBD (pET-32a/L-HEP) для засева ферментера

Два литра среды LB, содержащей ампициллин в концентрации 100 мкг/мл, засеивали размороженной суспензией клеток *E. coli* BL21(DE3)/pL-HEP-H6-CBD (или pET-32a/L-HEP) в количестве 0.1% и культивировали в качалочных колбах в течение ночи (14 ч) при 32°C (170 об./мин). Оптическая плотность посевной культуры составила (4.9) опт. ед. Общий объем инокулята составил 2 л.

Культивирование штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pL-HEP-H6-CBD (pET-32a/L-HEP) в ферментере

Ферментацию штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pL-HEP-H6-CBD (или pET-32a/L-HEP) проводили в 200 л ферментере (MBR, Швейцария), содержащем стерильную питательную среду LB. Культивирование штамма-продуцента проводили при температуре 37°C, pH 7.0. Продолжи-

тельность культивирования 12.0 ч. Через 7–7.5 часов от начала культивирования (при достижении оптической плотности культуральной жидкости, равной 28–30 оптическим единицам) проводили индукцию биосинтеза гибридного белка в клетках культуры посредством введения в ферментер водного раствора ИПТГ до конечной концентрации 0.22 ммоль/л. Через 4–4.5 часа после введения в аппарат индуктора биосинтеза гибридного белка процесс останавливали. Во время культивирования осуществляли наблюдение за процессом, фиксируя значения показателей: время роста, температура культивирования, pO_2 , pH, оптическая плотность при длине волны 600 нм. Сбор биомассы клеток осуществляли на проточной центрифуге Z81 G (SEPA, Германия) при температуре 20°C. Было получено 8 кг влажной биомассы.

Разрушение биомассы

Полученную биомассу в количестве 500 г суспендировали в буферном растворе (50 мМ Трис/НСl, 10 мМ ЭДТА, pH 8) в соотношении 1 : 10 и гомогенизировали на лабораторном гомогенизаторе APV–1000 (Германия) при температуре 5°C. Степень разрушения клеток определяли микроскопированием. Разрушенную клеточную суспензию центрифугировали на центрифуге 34 Z383K Hermle Labor Technik (Германия) при 11500 об./мин, 40 мин, 5°C. Полученные тельца включения (ТВ) взвешивали. Было получено 40 г биомассы с одного литра культуральной жидкости.

Отмывка телец включения, экстракция и ренатурация

ТВ отмывали буферным раствором, содержащим тритон X-100 (50 мМ Трис/НСl, 0.1% Triton X-100, pH 8) или мочевины (50 мМ Трис/НСl, 2 М мочевины, pH 8) в соотношении 1 : 10, после чего суспензию центрифугировали (5000 g, 20 мин, 4°C). Если использовали буферный раствор, в состав которого входил тритон X-100, то ТВ далее трижды промывали буфером 50 мМ Трис/НСl, pH 8. Если использовали буфер, содержащий мочевины, то ТВ промывали буфером 50 мМ Трис/НСl, pH 8 один раз.

ТВ экстрагировали буферным раствором 50 мМ Трис, 6 М мочевины, pH 10 в соотношении 1 : 10. Солюбилизованный белок разбавляли буфером для ренатурации (50 мМ Трис, 20% глицерин, pH 10) до конечной концентрации белка 0.7 мг/мл и инкубировали при 25°C в течение 18 ч.

Аффинная хроматография гибридного белка

В работе использовали хроматографическую систему Akta Basic 100 (GE, США), и колонку XK 26/40 (GE, США), заполненную сорбентом Ni

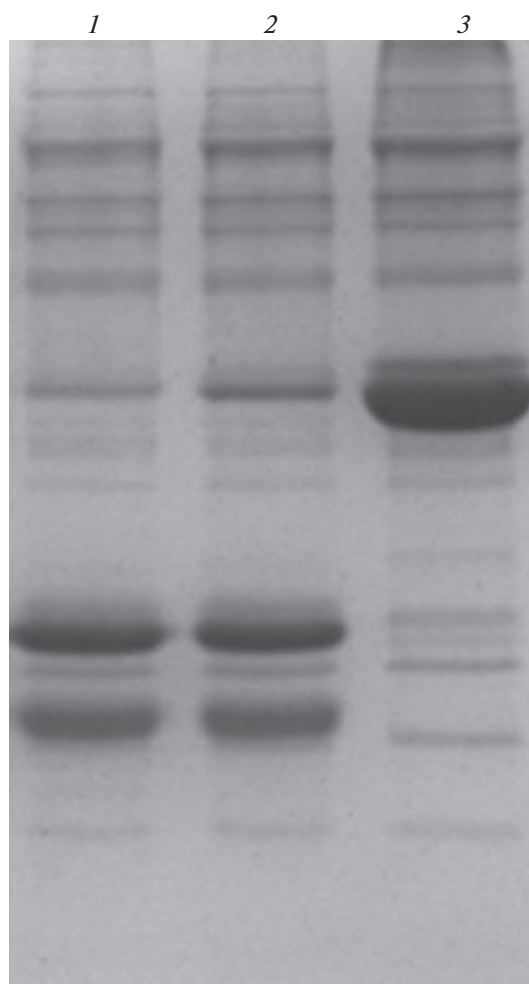


Рис. 8. Электрофореграмма расщепления модельного гибридного белка 1 (25°C, время контакта 12 с) иммобилизованным ферментом i-t-L-HEP; 1 – третий цикл, 2 – шестой цикл, 3 – отрицательный контроль.

Sepharose® 6 Fast Flow (GE, США) объемом 43 мл, который перед нанесением раствора белка был уравновешен сначала тремя объемами 100 мМ раствора $NiSO_4$, а затем тремя объемами буферного раствора (50 мМ Трис/НСl, 0.5 М NaCl, pH 8). Перед нанесением на колонку pH ренатурационной смеси доводили до 8 добавлением раствора соляной кислоты, а также добавляли хлористый натрий до конечной концентрации 0.5 М. После нанесения белкового раствора сорбент промывали двумя объемами буфера (50 мМ Трис/НСl, 0.5 М NaCl, pH 8) и элюировали сорбированный белок двумя объемами буфера, содержащего имидазол (0.250 М имидазол, 25 мМ Трис/НСl, 0.5 М NaCl, pH 8). Скорость потока составляла 5 мл/мин.

Гель-фильтрация

В работе использовали хроматографическую систему Akta Basic 100 (GE, США) с колонкой XK

16/100 (GE, США), заполненной сорбентом Sephadex G-25 (GE, США), объемом 170 мл. Сорбент перед нанесением раствора белка уравнивали тремя объемами буферного раствора (50 мМ Трис/НСl, pH 8), 20 мл элюата после аффинной хроматографии наносили со скоростью 1 мл/мин, элюцию белка проводили тем же буфером.

Иммобилизация t-L-HEP на хитиновом сорбенте

1 мл хитинового сорбента (НЕВ, Англия) уравнивали 3 объемами буферного раствора 50 мМ Трис/НСl, 100 мМ NaCl, pH 8, а затем наносили на него 10 мл раствора t-L-HEP с концентрацией 1 мг/мл со скоростью 1 мл/мин. После нанесения раствора белка сорбент промывали тремя объемами исходного буферного раствора.

Расщепление модельных ГБ

Активность рекомбинантной L-HEP, t-L-HEP и ее иммобилизованного варианта, i-t-L-HEP, определяли с помощью электрофоретического метода по степени расщепления модельных гибридных белков, Trx-интерферон альфа-2b (модельный гибридный белок 1, мГБ-1) или Trx-пуротоксин-6 (модельный гибридный белок 2, мГБ-2), содержащих специфический сайт узнавания энтеропептидазы. В 10 мл белкового раствора, содержащего модельный гибридный белок с концентрацией 3 мг/мл, вносили L-HEP или t-L-HEP в соотношения фермент/субстрат 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200 и 1 : 400. Общие условия реакции: 50 мМ Трис/НСl, pH 8, 25°C, 1–24 ч. При использовании мГБ-1 добавляли ДТТ до конечной концентрации 0.5 мМ.

Через 0.5 мл i-t-L-HEP пропускали 10 мл раствора мГБ-1 в 50 мМ Трис/НСl, pH 8, 0.5 мМ ДТТ при 25°C, время контакта субстрата с ферментом от 12 до 60 с. Процедуру проводили 6 раз. В процессе отбирали пробы для электрофоретического анализа.

Аналитические методы контроля

Электрофоретический анализ белковых растворов осуществляли, используя систему PowerPac HC (BioRad, США), в 15% ПААГ по Лэммли [23]. Гели окрашивали раствором Coomassie R-250 (2.5 мг/мл). Концентрацию белка в растворах измеряли с помощью спектрофотометра Ultrospec – 1000 (Amersham Pharmacia Biotech, Great Britain) по методу Бредфорда [24].

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kaur J., Kumar A., Kaur J. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. V. 106. P. 803–822. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080>
2. Waugh D.S. // *Protein Expr. Purif.* 2011. V. 80. P. 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.08.005>
3. Barrett A., Rawlings N.D., Woessner J. // Elsevier, London, 2004. 2nd ed. P. 1513–1517.
4. Zheng X.L., Kitamoto Y., Sadler J.E. // *Front. Biosci. (Elite Ed.)* 2009. V. 1. P. 242–249.
5. Kitamoto Y., Veile R.A., Donis-Keller H., Sadler J.E. // *Biochemistry.* 1995. V. 34. P. 4562–4568. <https://doi.org/10.1021/bi00014a008>
6. Lu D., Yuan X., Zheng X., Sadler J.E. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 31293–31300. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.50.31293>
7. Lu D., Fütterer K., Korolev S., Zheng X., Tan K., Waksman G., Sadler J.E. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 292. P. 361–373. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3089>
8. Light A., Janska H. // *Trends Biochem. Sci.* 1989. V. 14. P. 110–112. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(89\)90133-3](https://doi.org/10.1016/0968-0004(89)90133-3)
9. Mann N.S., Mann S.K. // *Exp. Biol. Med.* 1994. V. 206. P. 114–118. <https://doi.org/10.3181/00379727-206-43728>
10. Light A., Janska H. // *J. Protein Chem.* 1991. V. 10. P. 475–480. <https://doi.org/10.1007/bf01025475>
11. Gasparian M.E., Ostapchenko V.G., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // *Biochem.* 2006. V. 71. P. 113–119. <https://doi.org/10.1134/S0006297906020015>
12. LaVallie E.R., Rehemtulla A., Racie L.A., DiBlasio E.A., Ferenz C., Grant K.L., Light A., McCoy J.M. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 23311–23317.
13. Svetina M., Krasevec N., Gaberc-Porekar V., Komel R. // *J. Biotechnol.* 2000. V. 76. P. 245–251. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00191-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00191-1)
14. Choi S.I., Song H.W., Moon J.W., Seong B.L. // *Biotechnol. Bioeng.* 2001. V. 75. P. 718–724. <https://doi.org/10.1002/bit.10082>
15. Melicherová K., Krahulec J., Šafránek M., Lišková V., Hopková D., Szélliová D., Turňa J. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017. V. 101. P. 1927–1934. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7960-3>
16. Azhar M., Somashekhar R. // *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2015. V. 45. P. 268–278. <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.907185>
17. Gasparian M.E., Ostapchenko V.G., Schulga A.A., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // *Protein Expr. Purif.* 2003. V. 31. P. 133–139. [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(03\)00159-1](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(03)00159-1)
18. Chun H., Joo K., Lee J., Shin H.-C. // *Biotechnol. Lett.* 2011. V. 33. P. 1227–1232. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0562-3>

19. *Simeonov P., Berger-Hoffmann R., Hoffmann R., Stratter N., Zuchner T.* // Protein Eng. Des. Sel. 2011. V. 24. P. 261–268.
<https://doi.org/10.1093/protein/gzq104>
20. *Skala W., Goettig P., Brandstetter H.* // J. Biotechnol. 2013. V. 168. P. 421–425.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.10.022>
21. *Tan H., Wang J., (Kent) Zhao Z.* // Protein Expr. Purif. 2007. V. 56. P. 40–47.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.07.006>
22. *Bertani G.* // J. Bacteriol. 1951vol. 62. P. 293–300.
23. *Laemmli U.K.* // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
24. *Bradford M.M.* // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.

Development of the Pilot Technology for Production of Recombinant Human Enteropeptidase Light Chain in Soluble and Immobilized Forms

D. A. Makarov*[#], A. A. Zinchenko*, V. N. Stepanenko*, D. S. Kalinin*^{},
T. D. Melikhova*, E. A. Nokel*, M. E. Gasparyan*, I. V. Myagkih*, and D. A. Dolgikh*^{**}**

[#]Phone: +7 (985) 699-77-47; e-mail: youngchemist@mail.ru

**Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997 Russia*

***Lomonosov Moscow State University, GSP-1, Leninskie Gory, Moscow, 119991 Russia*

Enteropeptidase, a proteolytic enzyme of EC 3.4.21.9, is a glycoprotein consisting of two heavy and light polypeptide chains. The light chain of the enzyme is a serine proteinase, recombinant variants of which are used in biotechnology for the cleavage of peptide bonds in hybrid proteins after a specific recognition site DDDDK- or DDDDR-. We have developed a pilot method for producing a recombinant human enteropeptidase light chain containing a cascade of two affinity tags. The constructed expression plasmid vector pL-HEP-H6-CBD encoding a fusion protein containing a human enteropeptidase light chain sequence, metal binding and chitin binding domains was transformed into *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) and, after expression of the HEP-H6-CBD fusion protein, relatively simple scheme for renaturation and purification of the enzyme was developed. After immobilization of the purified preparation on a chitin carrier, the enzyme retained the activity of specific cleavage of substrates for at least 6 cycles.

Keywords: recombinant protein, enteropeptidase, immobilized enzyme