

Ткачова І.П., Грегірчак Н.М.

Національний університет харчових технологій, м. Київ, Україна

ПІДБІР СХЕМИ ХРОМАТОГРАФІЧНОГО ОЧИЩЕННЯ АЛЬФА-2В-ІНТЕРФЕРОНУ

Технологія отримання біологічно активного рекомбінантного α -2b-інтерферону заснована на створенні бактеріального штама-продуцента, що містить кДНК-інтерферону альфа людини. Розроблена схема виділення і очистки біологічно активного рекомбінантного α -2b-інтерферону. Чистота препарату склала близько 97-98 %. Біологічна активність на культурі чутливих клітин в цитопатичному тесті склала $2,05 \cdot 10^8$ МЕ/мл.

Technology of biologically active recombinant α -2b-interferon is based on the creation of bacterial strains, strains containing the cDNA of human interferon alpha. The scheme of isolation and purification of biologically active recombinant α -2b-interferon. Room preparation was about 97-98 %. Biological activity of sensory cells in culture cytopathic test was $2.05 \cdot 10^8$ IU / ml.

Рекомбінантний альфа-2b-інтерферон - аналог природнього людського білку, широко використовується в медицині. Завдяки йому людство задовольнило потребу в лікувальних препаратах проти багатьох вірусних та бактеріальних інфекцій. Для кожного рекомбінантного білка, що використовується як терапевтичний препарат, необхідно підібрати свою оптимальну схему виділення та очистки. Для рекомбінантного альфа-2b-інтерферона неможливо провести очистку без переведення структури молекули білку в нативний стан. В процесі ренатурації відновлюються також біологічні властивості молекули рекомбінантного альфа-2b-інтерферона.

Метою даної роботи було визначення найефективніших методів виділення і очищення для отримання фармакологічного препарату рекомбінантного альфа-2b-інтерферону.

В роботі використовувався бактеріальний штам *Escherichia coli* BL21(DE3) В F⁻ *dcm ompT hsdS*(r_B- m_B-) *gal* λ (DE3) трансформований рекомбінантними плазмідами. Плазміда pET24 була отримана на основі експресуючого вектора pET24a ("Novagen"), транскрипція структурного гена в якому регулюється промотором lac-оперона. Рекомбінантна плазміда pET24, містить ген Кап і послідовність, що кодує T7 термінатор транскрипції.

Отримання компетентних клітин і трансформація рекомбінантних білків. Компетентні клітини отримали за стандартною методикою з використанням CaCl₂ [1]. Трансформовані відповідними рекомбінантними плазмідами pTTKm і pET24 клітини висівали газоном на чашки Петрі з агаризованим середовищем LB, яке містило антибіотики канаміцин і хлорамфенікол концентрацією 50 мкг/мл і 34 мкг/мл, ізольовані клони-трансформанти використовували для отримання інокуляту, який вирощували за температури 30 °C протягом 16–18 год.

Лізис біомаси і відмивка тілець включення. Лізис клітин продуцентів IFN/pTTKm і IFN/pET24 проводили обробкою лізоцимом і ДНК-азою за присутності іонів Mg²⁺. Тільця включення збирали центрифугуванням при 11000 об/хв протягом 25 хв на центрифугу JOUAN KR22i.

Схеми очистки тілець включення рекомбінантного α _{2b}-інтерферона із різних продуцентів IFN/pTTKm і IFN/pET24 відрізнялися. Тільця включення α -2b-IFN/pTTKm обробляли серією відмивних розчинів, які мають у своєму складі: детергенти (тритон X-100, твін-20), сечовину та ізопропанол. Розчинення тілець включення проводили в розчині – 6 М гуанідин, 10 мМ дитіотреїтол, 20 мМ Трис-НСl, рН-8,0. Для тілець включення α -2b-IFN/pET24a була розроблена схема очистки відмивними розчинами, які мають: детергент (дезоксигелат натрія), ЕДТА. Розчин, в якому розчиняли тільця включення, містив 8 М сечовину, 20 мМ

Трис-НСІ, рН-8,0, 10 мМ ДТТ, 1 мМ ЕДТА. Рефолдинг проводили в буфері наступного складу: 20 мМ Трис-НСІ, рН-8,0, 70 мМ NaCl, 0,1 % Тритон Х-100, 0,1 % твін-20, 5 мМ ДТТ. *Електрофорез*. Електрофоретичний аналіз біомаси і білків проводили в 15 % поліакріламідному гелі (ПААГ) в денатуруючих умовах за присутності 1 % додецилсульфатнатрію (SDS). Як стандарт використовували набір білків з різними молекулярними масами Protein-standart IV (Merck, Германия). Сканування фарбованих поліакріламідних гелей і розрахунок відносного складу цільового білку визначали за допомогою програмного забезпечення GelScan Standart V5 []

Хроматографічне очищення α -2b-IFN рЕТ. Хроматографічну очистку інтерферону виконали у три стадії. Отриманий ренатурований білок на першому етапі піддали очистці за допомогою сорбенту CM – Toyopearl-650M. На другій стадії хроматографічного очищення розчин інтерферону нанесли на сорбент DEAE – Toyopearl-650 M. Очистка мономерної форми інтерферону від залишків полімерних форм проводили гель-фільтрацією на смолі типу TSK-гель «Toyopearl» HW-55 (Японія).

Для отримання очищеного рекомбінантного альфа-2в-інтерферону використовували штам-продуцент *Escherichia coli* BL21(DE3) трансформований рекомбінантною плазмідною на основі вектора рЕТ24а із тілець включення, одержаних відмиванням 1 %-им розчином дезоксихелатнатрія (ДОХН). Очищені тільця включення мали досить високий ступінь чистоти (близько 60 % від загального білку) та вихід 50 мг з 1 г біомаси. Раніше з такою концентрацією ДОХН рекомбінантний інтерферон у відмивках не був присутнім. Тому далі вміст ДОХН зменшили з 1 % до 0,1 %.

Тільця включення розчиняли в 6 М гуанідин хлориді за присутності 100 мМ 2-МЕ. Після розчинення цільовий білок ренатуровали в буфері: гліцерин 20 %, 20мМ Трис-НСІ, рН-8, 0,1мМ ФМСФ, 10 мМ2 МЕ) в розведенні 1:50 та 1:20. Було помічено, що при розведенні 1:50 вихід денатурованого білку збільшився в 2,3 рази. Для зв'язування рекомбінантного інтерферону з хроматографічною колонкою розчин денатурованого білку розводили в 4 рази урівноважуючим буфером (25 мМ ацетату амонія, рН – 3,8). Вихід ренатурованого α -2b – інтерферону склав близько 20 мг з 1 г вологості біомаси.

Подальша очистка проводилася на іонообмінних сорбентах: CM-toyopearl, DEAE-toyopearl, Sephadex G-50. На першому етапі хроматографічної очистки рекомбінантного α -2b - інтерферону використовували катіонообмінник CM-toyopearl 550M. Елюцію білку з сорбенту здійснювали в градієнті хлориду натрія від 0 до 1 М при рН 5,1. Вихід цільового білка склав близько 20 % від вихідного.

Другий етап очистки проводили на аніонообміннику DEAE-toyopearl 550 M. Елювали білок в градієнті хлориду натрія від 0 до 0,3 М. Вихід цільового білка на другому етапі склав 42 %.

Третю хроматографічну очистку проводили на сорбенті Sephadex G-50 при рН 4,0. Розчин білку перед нанесенням розводили в 4 рази розчином, що містить 25 мМ ацетату амонія і титрували до значення рН 4,0 розчином оцтової кислоти. Елюцію білку здійснювали в градієнті хлориду натрія від 0 до 0,2 М при рН 5,1. Вихід на третьому етапі - 90,7 %. Запропонована схема очистки рекомбінантного білку дозволить отримати субстанцію інтерферону з чистотою більш ніж 97 %. Біологічна активність становила – $2,05 \cdot 10^8$ МО/мл.

Результати роботи можуть бути використані у створенні сучасних фармакологічних препаратів на основі інтерферонів, які лікують низку хвороб, зокрема герпес, гепатит С, СНІД, захворювання уrogenітального тракту та ін.

Література

1. Орловська І.В., Грабченко Н.І., Снівак М.Я. Оптимізація умов культивування штамів *Escherichia coli* – продуцентів рекомбінантного альфа-2b-інтерферону // Мікробіологічний журнал. – 2007. – Т.69, №2. – 67с.