

UDC 579.69 + 577.112

# Конструювання, синтез, функціональна характеристика і практичне застосування злитого білка SPA-VARmut

О. Б. Горбатюк<sup>1</sup>, О. В. Окунєв<sup>1,2</sup>, Ю. С. Ніколаєв<sup>1</sup>,  
О. В. Святенко<sup>1,3</sup>, В. А. Кордюм<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Інститут генетичної і регенеративної медицини НАМН України  
Вул. Червоноармійська, 57/3, Київ, Україна, 03150

<sup>2</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680

<sup>3</sup>Національний авіаційний університет  
Пр. Комарова, 1, Київ, Україна, 03058

gorbatuyk@ukr.net

**Мета.** Створення генно-інженерного злитого білка SPA-VARmut та його застосування як вторинного імунореагенту в імунологічних тестах. **Методи.** Клонування генів, ПЛР, секвенування ДНК, культивування бактерій, електрофорез, синтез і очищення білків, ELISA, вестерн-блот. **Результати.** З використанням послідовностей ДНК, що кодують білок A *Staphylococcus aureus* (SPA) і бактерійну лужну фосфатазу з покращеними каталітичними властивостями (VARmut), сконструйовано ген злитого білка SPA-VARmut та забезпечено його препаративне отримання у розчинній формі внаслідок синтезу в клітинах *Escherichia coli*. Визначено умови ферментації, за яких вихід SPA-VARmut становить приблизно 1 г/л культури *E. coli*. Із застосуванням методу металоафінної хроматографії одержано цільовий білок з чистотою понад 95 %. SPA-VARmut термостабільний, а обидва його компоненти (SPA і VARmut) зберігають імуноглобулінз'язувальну і фосфатазну активність тривалий час. SPA-VARmut дозволяє виявляти щонайменше 5 нг антигену та 1 мкг/мл антитіл. **Висновки.** Показано можливість використання SPA-VARmut як універсального вторинного імунореагенту в імунохімічних тестах.

**Ключові слова:** білок A, бактерійна лужна фосфатаза, злитий білок, імунодіагностика.

**Вступ.** Білок A *Staphylococcus aureus* (SPA) складається з п'яти імуноглобулінз'язувальних доменів (E, D, A, B, C), кожен з яких здатний специфічно взаємодіяти з Fc-фрагментами IgG різних видів тварин і людини [1]. Тому SPA широко застосовують в афінній хроматографії при створенні сорбентів для очищення антитіл або сепарації крові хворих на аутоімунні захворювання від аутоантитіл та циркулюючих імунних комплексів [2, 3]. Ще одним перспективним напрямком використання SPA є діагностика. Кон'югати SPA з лужною фосфатазою, пероксидазою хрому і міченим йодом застосовують в імуноло-

гічних тестах. Зазвичай таку кон'югацію проводять хімічним способом. Однак хімічна кон'югація має низку недоліків: 1) потреба в значній кількості очищених компонентів; 2) висока гетерогенність кінцевого продукту; 3) необхідність розділення повнорозмірних кон'югатів від некон'югованих компонентів. У свою чергу, технологія рекомбінантних ДНК забезпечує створення генетичних конструкцій, які можуть бути використані для отримання химерних біфункціональних білків у гетерологічних системах, серед яких *Escherichia coli*.

Партнером для злиття із SPA обрано бактерійну лужну фосфатазу з покращеними каталітичними властивостями (VARmut). Збільшення каталітичної

активності VAPmut досягали за рахунок двох амінокислотних замін D153G і D330N (заміна аспарагінової кислоти на аспарагін і гліцин у 153 та 330 положеннях відповідно) [4].

**Матеріали і методи.** Конструювання і синтез SPA-VAPmut. ДНК-послідовність SPA отримано ПЛР-ампліфікацією з хромосомної ДНК *S. aureus*, одержаної за допомогою набору реагентів «Genomic DNA Purification Kit» («Fermentas», Литва). Для проведення ПЛР використано пару специфічних праймерів, які вводили сайти рестрикції *NdeI* і *NotI*. Очищений продукт ПЛР (~880 п. н.) гідролізували відповідними рестриктазами і клонували у плазмідний вектор *pET-24a* (результуюча плазміда – *pET-SPA*) [5].

**Праймери для проведення ПЛР:** сенсовий SPA – *NdeI*: 5'-ATCATATGGCGCAACACGATGAAGCTCAAC-3'; антисенсовий SPA – *NotI*: 5'-ATGCGGC CGTTCCTCTTTGGTGC-3'.

Для отримання послідовності ДНК, яка кодує VAPmut, використано плазмиду *pCANTAB-ScFv-VAPmut* і пару праймерів, які вводили сайти рестрикції *NotI* і *XhoI*. Очищений продукт ПЛР (~1360 п. н.) гідролізували відповідними рестриктазами і субклонували у плазмідний вектор *pET-SPA*. ПЛР проводили з використанням такої пари праймерів: сенсовий VAPmut – *NotI*: 5'-ACGGGCGGCCGCTA CACCAGAA-3'; антисенсовий VAPmut – *XhoI*: 5'-CGGCGAGACCCCGACTTTGAGCTCACTA-3'.

Для експресії SPA-VAPmut одержаною плазмідною *pET24-SPA-VAPmut* трансформували клітини *E. coli* BL21 (DE3). Синтез білка індукували за протоколом аутоіндукції [6]. Локалізацію і кількісний вміст цільового білка в сумарному лізаті клітин-продуцентів визначали електрофоретичним розділенням розчинної і нерозчинної фракцій білків цитоплазми клітини.

**Очищення SPA-VAPmut** проводили методом металоафінної хроматографії за нативних умов. Металохелатуючу колонку HiTrap об'ємом 1 мл урівноважували іонами  $Ni^{2+}$  та приєднували до автоматизованої хроматографічної системи FPLC («Pharmacia», Швеція), урівноважували буфером (100 мМ трис-НСІ (рН 8,0), 300 мМ NaCl, 10 мМ імідазол) і наносили фракцію розчинних білків цитоплазми клітин *E. coli*, попередньо профільтровану через 0,45

мкм-мембранний фільтр PVDF («Millipore», США). Сорбент відмивали від неспецифічно зв'язаних білків зазначеним буфером до виходу пера самописця на ізолінію. SPA-VAPmut елюювали буфером – 100 мМ трис-НСІ (рН 8,0), 300 мМ NaCl, 300 мМ імідазол. Очищений білок діалізували проти буфера, який містить 100 мМ трис-НСІ (рН 9,5), 140 мМ NaCl, 15 мМ  $MgSO_4$ . Гомогенність очищеного білка аналізували у 12 %-му ДСН-ПААГ [7], концентрацію SPA-VAPmut визначали за відомою величиною абсорбції  $A_{280}$ , яку розраховували для даної послідовності із застосуванням програми Vector NTI.

**Використання SPA-VAPmut як вторинного імунореагенту.** ELISA, залежна від антитіл. В лунки полістиролового планшета для ELISA («Nunc») вносили rhIFN $\alpha$ 2b у 50 мМ Na-карбонатному буфері (рН 9,5) в концентрації 10 мкг/мл та інкубували упродовж 1 год при 37 °С. Після промивань лунок буфером PBST додавали афінно очищені поліклональні антитіла кроля проти rhIFN $\alpha$ 2b у діапазоні концентрацій 100–0,1 мкг/мл та SPA-VAPmut – у концентрації 0,5 мкг/мл. Утворені імунні комплекси проявляли з використанням хромогенного субстрату для фосфатази (*p*-нітрофенілфосфату, pNPP, «Sigma», США). Після проявлення забарвлення реакцію зупиняли внесенням 1 М NaOH і вимірювали величину адсорбції  $A_{405}$  на багатоканальному фотометрі Multiscan MCC/340 («Titertek», США).

**Антиген-залежна ELISA.** В лунки полістиролового планшета для ELISA («Nunc», Данія) вносили rhIFN $\alpha$ 2b (ВНДК «ФармБіотек», Україна) в 50 мМ Na-карбонатному буфері (рН 9,5) в концентрації 1–500 нг на лунку та інкубували протягом 1 год при 37 °С. Після промивань лунок буфером PBS, який містить 0,1 % твін-20 (PBST), вносили афінно очищені поліклональні антитіла кроля проти rhIFN $\alpha$ 2b [8] у концентрації 1 мкг/мл та SPA-VAPmut – у концентрації 0,5 мкг/мл.

**Дот-блот-аналіз.** На нітроцелюлозну мембрану Hybond-C Extra («Amersham Biosciences», Велика Британія) наносили антиген rhIFN $\alpha$ 2b у кількості 5–20 нг. Після блокування місць неспецифічного зв'язування буфером PBS + 3 % молоко (PBSM) мембрану з іммобілізованими білками інкубували протягом 1 год з очищеними поліклональними антитілами кроля проти rhIFN $\alpha$ 2b у концентрації

1 мкг/мл. Як негативний контроль на мембрану наносили антиген rhExCD34 [9]. Мембрану проявляли з використанням SPA-BAPmut у концентрації 0,5 мкг/мл та нерозчинного колориметричного субстрату для фосфатази BCIP-T/NBT («Sigma»).

**Визначення термостабільності злитого білка SPA-BAPmut.** Аліквоти очищеного злитого білка SPA-BAPmut (1 мг/мл у буфері 0,1 М трис-НСІ (рН 9,5), 0,14 М NaCl, 15 мМ MgSO<sub>4</sub>) інкубували за таких температур: +4, +50, +70, +85, +95, -20, -70 °С протягом 10 хв. Ферментативну активність лужної фосфатази та IgG-зв'язувальну активність білка А визначали в ELISA.

**Результати і обговорення.** Окрім афінної хроматографії, для виявлення антитіл і специфічних антигенів перспективним є використання SPA, злитого з маркерною молекулою. Під час вибору останньої брали до уваги такі характеристики, як висока ферментативна активність, широкий спектр комерційно доступних субстратів, значна термостабільність, невеликі розміри, можливість отримання бактерійним синтезом і стабільність при кон'югації з іншими білками. У кінцевому підсумку обрано лужну фосфатазу (AP – alkaline phosphatase), яку широко використовують при створенні імунокон'югатів для імунохімічних методів. Лужна фосфатаза ссавців (MAP – mammalian alkaline phosphatase) характеризується високим значенням  $k_{cat}$  (приблизно 2000 с<sup>-1</sup>) і термостабільністю ( $T_m \sim 65$  °С) [4]. Імунокон'югати з MAP зазвичай одержують хімічною кон'югацією [10]. Бактерійна лужна фосфатаза (BAP – bacterial alkaline phosphatase) є менш активною, ніж MAP, значення  $k_{cat}$  для неї дорівнює 65–80 с<sup>-1</sup>, однак вона більш термостабільна –  $T_m$  становить  $\sim 95$  °С. Імунокон'югати з BAP можна одержувати як традиційною хімічною кон'югацією, так і зручнішим способом, тобто генно-інженерним поєднанням послідовності BAP із послідовністю детектуючої молекули. Висока термостабільність, здатність до утворення генно-інженерних кон'югатів, а також можливість ефективного одержання таких кон'югатів у активній формі бактерійним синтезом роблять BAP перспективною альтернативою MAP. У зв'язку з цим ми віддали перевагу BAP як маркерній молекулі з підвищеною каталітичною активністю (BAPmut).

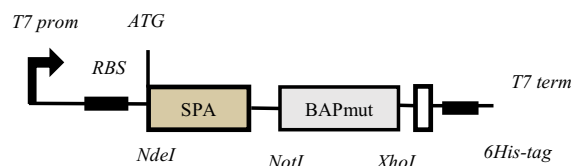


Рис. 1. Схема розташування елементів експресувальної касети SPA-BAPmut у векторі *pET-24a(+)*

У результаті порівняльного аналізу структури активних центрів MAP та BAP визначено амінокислотні заміни, які значно покращують каталітичну активність останньої. Наприклад, амінокислотні заміни K328N/D330N збільшують ферментативну активність BAP у 3 рази, D153N/K328N, D153N/K328N/D330N – у 8 разів, D153N/D330N – до 17 разів. Однак більшість перерахованих мутацій одночасно з підвищенням ферментативної активності призводять до суттєвого зменшення термостабільності ферменту, що знижує цінність останнього як складової частини імунореагентів. У роботі [4] знайдено мутації D330N/D153G, які забезпечують збільшення каталітичної активності BAP від 17 до 40 разів (залежно від складу інкубаційного середовища) і при цьому не впливають на термостабільність ферменту. BAP із зазначеними властивостями (амінокислотні заміни D330N/D153G) використано для отримання SPA-BAPmut.

Інтерактивний дизайн химерного білка SPA-BAPmut проводили з урахуванням особливостей структури обох білків-партнерів та топології їхніх активних центрів. Встановлено, що оптимальним є дизайн химерного білка, який передбачає приєднання BAPmut до С-кінця SPA. Таке взаєморозташування зберігає функціональні властивості фосфатази, оскільки при цьому не залучається С-кінець, який бере участь у формуванні активного центра. Зазначене розташування SPA відносно ферменту не заважає процесу димеризації молекули фосфатази, що є необхідним для її функціонування та збільшує авідність утвореного імунокон'югату і, отже, підвищує його чутливість (рис. 1). У той час як розміщення фосфатази на N-кінці злитого партнера є причиною втрати функціональної активності останнього [11].

Для бактерійної експресії плазмідним вектором *pET-24-SPA-BAPmut* (Матеріали і методи) транс-

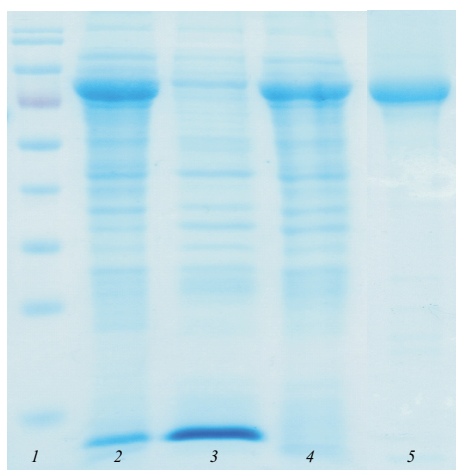


Рис. 2. Синтез SPA-VARmut в клітинах *E. coli*: 1 – білки – маркери молекулярної маси (130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15 і 10 кДа); 2 – тотальний лізат клітин-продуцентів, у яких індукували синтез SPA-VARmut; 3 – фракція нерозчинних білків клітини; 4 – фракція розчинних білків клітини; 5 – SPA-VARmut, очищений на металоафінному сорбенті та діалізований проти буфера 0,1 М трис-HCl, 0,14 М NaCl, 15 мМ MgSO<sub>4</sub>, pH 9,5

формували клітини *E. coli* штаму BL21(DE3) та індукували синтез SPA-VARmut за протоколом аутоіндукції [6]. Електрофоретичний аналіз лізатів бактерійних клітин показав наявність у них продукту очікуваної молекулярної маси (~78 кДа) (рис. 2). У результаті електрофоретичного розділення розчинної і нерозчинної фракції білків цитоплазми показано, що SPA-VARmut синтезується в розчинній формі, рівень його накопичення становить 37 % від вмісту сумарних білків клітин *E. coli* (~0,96 г/л бактерійної культури) при оптичній щільності  $A_{600} = 16,3$ . Це значення майже в 45 разів перевищує вихід аналогічного злитого білка SPA APK328A, отримання якого описано в роботі [12].

Для одержання кон'югатів такого типу застосовують комбінації наступних методів: руйнування клітин ультразвуком, центрифугування, іонообмінну хроматографію, гель-фільтрацію, хроматографію гідروفобних взаємодій, преципітацію, афінну хроматографію, до речі, остання є причиною зниження функціональної активності ферменту внаслідок жорстких умов елюції. Оскільки SPA-VARmut містить генетично введenu послідовність His-tag, його очищували на металоафінному сорбенті за нативних умов. Для зниження неспецифічної сорбції супутніх білків на сорбенті, що може мати суттєвий вплив на чистоту кінцевого продукту, сорбент промивали

#### Очищення SPA-VARmut на Ni-NTA сефарозі

Фракція	Об'єм, мл	Загальна кількість білка, мг	Функціональна активність VARmut, %
Розчинні білки цитоплазми	10	6	100
Після очищення SPA-VARmut на Ni-NTA-сефарозі	5,7	5,6	Не визначали
Після заміни буфера для елюції на буфер для VARmut	5,0	5,0	87

буферним розчином, який містить 300 мМ NaCl та 10 мМ імідазол.

Елюцію проводили буфером, концентрація імідазолу в якому становить 300 мМ. Зазначені умови забезпечують отримання SPA-VARmut з чистотою понад ~95 % (рис. 2). Після очищення SPA-VARmut діалізували проти буфера, оптимального для підтримання ферментативної активності лужної фосфатази (Матеріали і методи).

Узагальнені дані за результатами очищення SPA-VARmut на металоафінному сорбенті наведено в таблиці. Показано, що використання цього методу забезпечує отримання SPA-VARmut без суттєвих втрат самого продукту (вихід ~91,6 %) і його функціональної активності.

Очищений SPA-VARmut використовували як вторинний імуореагент для виявлення антитіл (ELISA) та антигену (ELISA, дот-блот). Встановлено, що SPA-VARmut достовірно виявляє IgG у концентрації ~500 нг/мл та менше як 5 нг антигену (rhIFN $\alpha$ 2b) (рис. 3, 4). Крім того, на відміну від більшості імуоферментних систем детекції, де застосовують специфічні мічені антивидові антитіла, використання SPA-VARmut дозволяє розширити діапазон первинних антитіл (SPA розпізнає Fc-фрагменти IgG людини, миші, кроля, морської свинки, бика).

Також визначали термостабільність злитого білка SPA-VARmut. Для цього аліквоти SPA-VARmut з однаковою концентрацією інкубували за різних температур (Матеріали і методи). Як контроль використовували SPA-VARmut, отриманий безпосередньо перед проведенням експерименту. Як видно з наведеної на рис. 5 діаграми, SPA-VARmut не втрачає імуоглобулінзв'язувальної та фосфатазної ак-

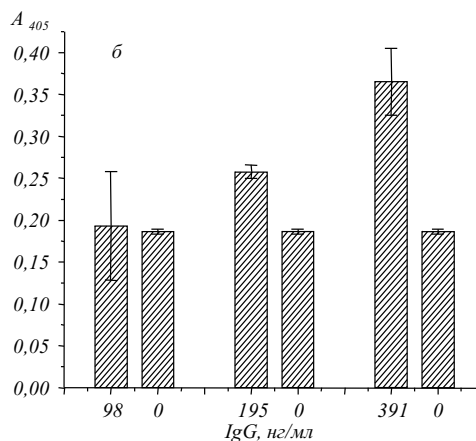
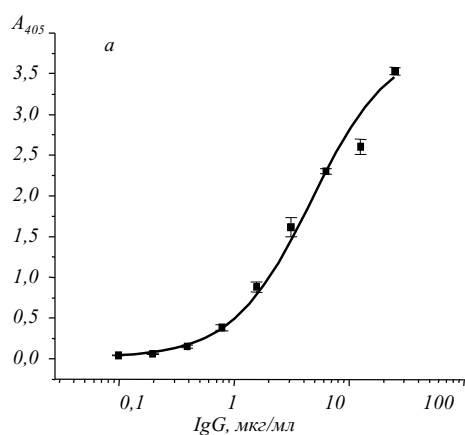


Рис. 3. Визначення мінімальної концентрації IgG, яка детектується за використання SPA-ВАРmut в ELISA

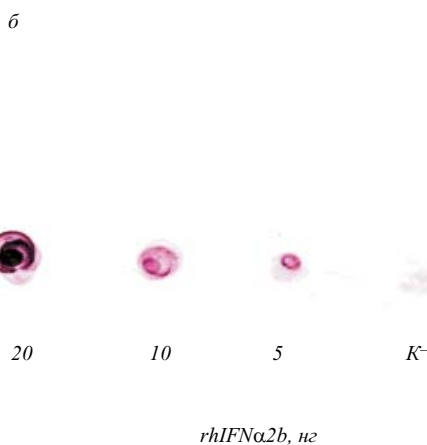
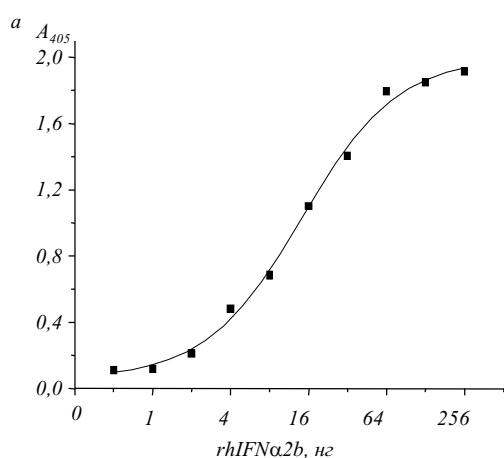


Рис. 4. Визначення концентрації антигену (rhIFNα2b), яка детектується з використанням SPA-ВАРmut в ELISA (a) дот-блоті (б)

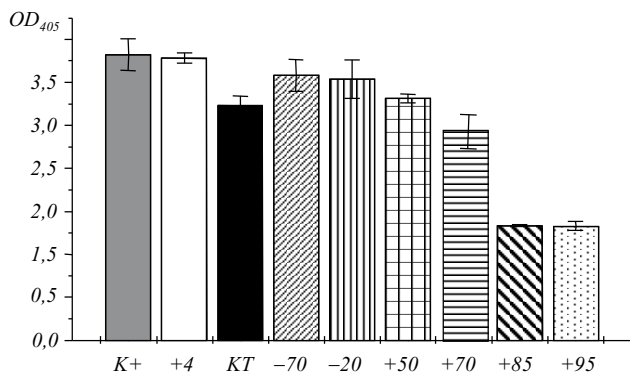


Рис. 5. Вплив різних температур на функціональну активність злитого білка SPA-ВАРmut: K+ – SPA-ВАРmut одразу після виділення з клітин *E. coli*; KT – кімнатна температура (доба); +4, +50, +70, +85, +95, -70, -20 °C (10 хв)

тивності при інкубації за температури до 70 °C, а також добре витримує вплив низьких температур (рис. 5). Висока термостабільність SPA-ВАРmut має важливе діагностичне значення, оскільки зазвичай комерційно доступні імунокон'югати є досить тер-

молабільними. Показано, що SPA-ВАРmut зберігає функціональну активність принаймні впродовж 6 місяців за умов зберігання у 50 %-му гліцерині за температури 4 °C у відповідному буфері.

Порівняно з його аналогами запропонований імунокон'югат має вищу чутливість завдяки збільшенню ферментативної активності ВАР. До того ж на противагу традиційним імунореагентам, одержаним хімічною кон'югацією, запропонований рекомбінантний химерний білок SPA-ВАРmut, отриманий у препаративних кількостях внаслідок досить простого і недорогого бактерійного біосинтезу у функціонально активному стані, дозволяє значно спростити методику його синтезу та зменшити вартість як лабораторного, так і промислового одержання імунореагентів подібного типу.

Поєднання генно-інженерних технологій, вископродуктивних систем експресії та очищення цільового продукту дасть можливість значно знизити вартість отримання подібних імунокон'югатів.

O. B. Gorbatiuk<sup>1</sup>, O. V. Okunev<sup>1,2</sup>, Yu. S. Nikolaev<sup>1</sup>, O. V. Svyatenko<sup>1,3</sup>, V. A. Kordium<sup>1,2</sup>

Construction, expression, functional characterization and practical application of fusion protein SPA-BAPmut

<sup>1</sup>State Institute of Genetic and Regenerative Medicine, NAMS of Ukraine

57/3, Chervonoarmiyska Str., Kyiv, Ukraine, 03150

<sup>2</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine

150, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03680

<sup>3</sup>National Aviation University

1, Komarova Ave., Kyiv, Ukraine, 03058

#### Summary

**Aim.** The creation of genetically engineered fusion protein SPA-BAPmut and its application as a secondary immunoreagent in immunoassays. **Methods.** Gene cloning, PCR, electrophoresis, DNA sequencing, bacteria cells culturing, protein expression and purification, ELISA, Western-blotting were used. **Results.** The DNA sequences encoding *Staphylococcus aureus* protein A (SPA) and bacterial alkaline phosphatase with enhanced catalytic activity (BAPmut) were used for construction of gene encoding fusion protein SPA-BAPmut that was expressed in the high-productive *Escherichia coli* system and obtained in a soluble form. Cultivation conditions to provide a high-level expression of SPA-BAPmut (> 1 g/l) were determined. The target protein was obtained with purity more than 95 % using IMAX method. SPA-BAPmut is thermostable, and both parts of fusion protein (SPA and BAPmut) retain their IgG binding and alkaline phosphatase activity for a long time. SPA-BAPmut was used as a substitute of secondary antibodies in immunoassays. As little as 5 ng of the antigen could be detected in Western blotting and 1 µg/ml of IgG in ELISA. **Conclusions.** The possibility of using SPA-BAPmut as universal secondary immunoreagent for different types of immunoassays was shown.

**Keywords:** protein A, bacterial alkaline phosphatase, fusion protein, immunoassays.

О. Б. Горбатюк, О. В. Окунев, Ю. С. Николаев, О. В. Святенко, В. А. Кордюм

Конструирование, синтез, функциональная характеристика и практическое применение слитого белка SPA-BAPmut

#### Резюме

**Цель.** Создание генно-инженерного слитого белка SPA-BAPmut и его использование как вторичного иммунореagenta в иммунологических тестах. **Методы.** Клонирование генов, ПЛР, секвенирование ДНК, культивирование бактерий, электрофорез, биосинтез и очистка белков, ELISA, вестерн-блот. **Результаты.** С использованием последовательностей ДНК, кодирующих белок A *Staphylococcus aureus* (SPA) и бактериальную щелочную фосфатазу с улучшенными каталитическими свойствами (BAPmut), сконструирован ген слитого белка SPA-BAPmut и обеспечено его препаративное получение в растворимой форме вследствие синтеза в клетках *Escherichia coli*. Определены условия ферментации, при которых выход SPA-BAPmut составляет около 1 г/л культуры *E. coli*. С применением метода металлоаффинной хроматографии целевой белок получен с чистотой более 95 %. SPA-BAPmut термостаби-

лен, а оба его компонента (SPA и BAPmut) сохраняют иммуноглобулинсвязывающую и фосфатазную активность на протяжении длительного времени. SPA-BAPmut позволяет детектировать 5 нг антигена и 1 мкг/мл антител. **Выводы.** Показана возможность применения SPA-BAPmut как универсального вторичного иммунореagenta в иммунохимических тестах.

**Ключевые слова:** белок А, бактериальная щелочная фосфатаза, слитый белок, иммунодиагностика.

#### REFERENCES

1. Moks T., Abrahmsen L., Nilsson B., Hellman U., Sjoquist J., Uhlen M. Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains // Eur. J. Biochem.—1986.—**156**, N 3.—P. 637–643.
2. Hober S., Nord K., Linholt M. Protein A chromatography for antibody purification // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.—2007.—**848**, N 1.—P. 40–47.
3. Doesch A. O., Mueller S., Konstandin M., Celik S., Frankenstein L., Zugck C., Dengler T. J., Fleming T., Bierhaus A., Katus H. A. Effects of protein A immunoadsorption on methylglyoxal levels in patients with chronic dilated cardiomyopathy and diabetes mellitus // Appl. Cardiopulm. Pathophysiol.—2011.—**15**.—P. 3–13.
4. Muller B. H., Lamoure C., Le Du M. H., Cattolico L., Lajeunesse E., Lemaitre F., Pearson A., Ducancel F., Menez A., Boulain J. C. Improving *Escherichia coli* alkaline phosphatase efficacy by additional mutations inside and outside the catalytic pocket // ChemBiochem.—2001.—**2**, N 7–8.—P. 517–523.
5. Gorbatiuk O. B., Tsapenko M. V., Pavlova M. V., Okunev O. V., Kordium V. A. Bioaffinity sorbent based on immobilized protein A *Staphylococcus aureus*: development and application // Biopolym. Cell.—2012.—**28**, N 2.—P. 141–148.
6. Studier F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures // Protein Expr. Purif.—2005.—**41**, N 1.—P. 207–234.
7. Westermeyer R. Electrophoresis in practice: a guide to methods and application of DNA and protein separations.—Weinheim: VCH, 1997.—331 p.
8. Okunev O. V., Gilchuk P. V., Irodov D. M., Deryabina O. G. Obtaining and characterization of the single chain antibodies against human  $\alpha 2\beta$ -interferon. // Ukr. Biochem. J.—2005.—**77**, N 5.—P. 106–115.
9. Nikolaiev Iu. S., Gorbatiuk O. B., Tsapenko M. V. The development of strategy for obtaining single-chain recombinant antibodies against cell-surface biomarkers on the example of human CD34 // Biopolym. Cell.—2010.—**26**, N 6.—P. 492–498.
10. Nilson B., Bjorck L., Akerstrom B. Enzyme linked immunosorbent assay using alkaline phosphatase conjugated with streptococcal protein G // J. Immunoassay.—1988.—**9**, N 2.—P. 207–225.
11. Zhang L., Buchet R., Azzar G. Distinct structure and activity recoveries reveal differences in metal binding between mammalian and *Escherichia coli* alkaline phosphatases // Biochem. J.—2005.—**392**, Pt 2.—P. 407–415.
12. Chowdhury P. S., Kushwaha A., Abrol S., Chaudhary V. K. An expression system for secretion and purification of a genetically engineered thermostable chimera of protein A and alkaline phosphatase // Protein Expr. Purif.—1994.—**5**, N 1.—P. 89–95.

Received 12.12.12