

УДК 577(с87.1+112.4)

КЛОНУВАННЯ ТА ЕКСПРЕСІЯ ФУНКЦІОНАЛЬНО АКТИВНОГО ФРАГМЕНТА D-E-A-A* ПРОТЕЇНУ А *Staphylococcus aureus*

О. С. Олійник
Д. В. Колибо
А. А. Кабернюк
А. Ю. Лабинцев
Н. В. Короткевич
С. І. Романюк
С. В. Комісаренко

Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України, Київ

E-mail: kolibo@biochem.kiev.ua

Отримано рекомбінантний фрагмент протеїну А *Staphylococcus aureus* з унікальною послідовністю, який складається з чотирьох доменів: D-E-A-A* і експресується в клітинах *Escherichia coli*. З метою перевірки його функціональної активності проведено тести на здатність взаємодіяти з імуноглобулінами, в яких використано кон'югати цього рекомбінантного фрагмента з пероксидазою хрому та наночастками колоїдного золота.

Встановлено, що рекомбінантний фрагмент протеїну А, мічений пероксидазою хрому або колоїдним золотом, має таку саму специфічність стосовно імуноглобулінів ссавців, як і природний протеїн А. Одержаний аналог протеїну А можна використовувати не лише при створенні хроматографічних сорбентів для виділення імуноглобулінів та імунохімічних кон'югатів з метою виявлення антитіл, але й у подальших фундаментальних дослідженнях імунобіологічних властивостей протеїну А.

Ключові слова: протеїн А, *Staphylococcus aureus*, рекомбінантний аналог, імуноглобулінзв'язувальна активність, імуноензимний аналіз, імунохроматографічні тести.

Протеїн А *Staphylococcus aureus* та його рекомбінантні аналоги завдяки здатності зв'язуватися з імуноглобулінами різних видів тварин широко використовують при створенні афінних сорбентів та біоспецифічних міток в імунохімії та біотехнології. Генно-інженерні похідні протеїну А мають ширшу сферу застосування, ніж сам протеїн А: їх, наприклад, використовують як мітки для афінного очищення інших рекомбінантних протеїнів, а також як рандомізовані афінні ліганди — афібоді з широким спектром специфічностей.

Протеїн А *S. aureus* (SPA — від англ. *Staphylococcal protein A*) має молекулярну масу 42 кДа, входить до складу клітинної стінки стафілокока і, як вважають, бере активну участь у патогенезі стафілококової інфекції. Протеїн А містить сигнальну С-кінцеву амінокислотну послідовність

LPXTG, що є характерною для багатьох інших адгезинів грампозитивних бактерій [1, 2]. SPA, що розташований на поверхні стафілокока, здатен зв'язувати імуноглобуліни переважно за їхні Fc-фрагменти, тобто в зворотній орієнтації, що дозволяє стафілококу уникати опсонізації, фагоцитозу та комплементзалежного лізису [3]. Також SPA притаманна здатність взаємодіяти з іншими протеїнами хазяїна, наприклад, з рецептором до фактора некрозу пухлин (TNFR1) [4] та фактором фон Віллібранта [5], що дає змогу стафілококу взаємодіяти з поверхнею клітин хазяїна та спричинювати запалення. Завдяки здатності зв'язуватися з Fab-фрагментами імуноглобулінових рецепторів наївних В-клітин, протеїн А стафілокока виявляє властивості суперантигена, тобто субстанції, яка може призвести до поліклональної активації імунної відповіді. Така

активація здебільшого закінчується загибеллю активованих клонів В-лімфоцитів, що зумовлює розвиток стану неспецифічної імуносупресії [6, 7]. Наявність у протеїну А таких властивостей відкриває можливість створення на його основі препарату для лікування ряду системних автоімунних порушень. Однак найширшою сферою практичного застосування протеїну А є використання його імуноглобулінзв'язувальної активності в біотехнологічній індустрії, зокрема у синтезі на основі цього протеїну афінних сорбентів для виділення імуноглобулінів, а також у створенні реагентів, здатних виявляти антитіла та їх комплекси з антигеном в імунохімічному аналізі [8].

Протеїн А є універсальним реагентом для візуалізації імунохімічних реакцій за участю антитіл багатьох видів ссавців. Це дає можливість, змінюючи лише антиген, використовувати принципи та підходи, що їх розроблено у процесі створення однієї тест-системи, для інших тест-систем, спрямованих на визначення антитіл до антигенів широкого кола збудників людини і тварин. Для застосування в імунохімії протеїн А кон'югує з різними мітками, такими як флуоресцентні барвники, ензими, колоїдні наночастки, радіоізотопи або залишки біотину. Така кон'югація майже не призводить до втрати здатності зв'язувати імуноглобуліни.

Біотехнологічна промисловість випускає сорбенти з протеїном А на основі латексних, магнітних і агарозних кульок. Такі сорбенти дозволяють вилучати антитіла із суміші, наприклад з асцитної рідини або із сироватки крові. Також за допомогою цих сорбентів можна проводити реакцію імунопреципітації для вилучення із суміші окремих протеїнів у складі імунних комплексів. Цікавий підхід було запропоновано для іммобілізації протеїну А на целюлозі: для цього використовували генетично-злитий протеїн, що складався з протеїну А та целюлозозв'язувального домену (CBD — cellulose-binding domain) *Clostridium cellulovorans* [9]. Окрім нативного протеїну А, дедалі частіше використовують його різні рекомбінантні аналоги. Наприклад, шляхом сайтспрямованого мутагенезу було отримано рекомбінантний аналог протеїну А, який містив заміну Asn на Ala в 28 положенні В-домену, що призвело до втрати здатності взаємодіяти з Fab-фрагментами імуноглобулінів без зміни афінності взаємодії з Fc-фрагментами. Водночас цей домен виявився більш стійким до протеолізу і розщеплення

гідроксиламіном, оскільки чутлива до розщеплення ділянка Asn-Gly була замінена на Ala-Gly. Такий змінений В-домен отримав назву Z-домену [10], а конструкції, що містять його тандемний повтор (ZZ-фрагмент), мають найширше практичне використання серед усіх рекомбінантних аналогів протеїну А [11] завдяки здатності цього фрагмента зв'язувати імуноглобуліни в такому ж самому молярному співвідношенні, що й природний протеїн А [12]. Послідовність, що кодує ZZ-фрагмент, використовують також у деяких комерційних векторах для експресії, що дозволяє спростити виділення та детекцію отриманих злитих протеїнів [11]. У низці робіт було показано, що використання протеїну А стафілокока чи його фрагментів як маркерних послідовностей у рекомбінантних протеїнах поліпшує фолдинг та підсилює вихід злитого протеїну в розчинній формі [13]. Для «м'якших» умов елюції антитіл штучно розробляють низькоафінні рекомбінантні аналоги протеїну А. Наприклад, збільшенням петлі між першою і другою альфа-спіралями вдалося отримати похідне Z-домену, комплекс якого з IgG дисоціює при pH 4,5 (комплекс не модифікованого Z-домену з IgG дисоціює при pH 3,3) [14].

Крім протеїну А стафілокока відомі й інші протеїни мікроорганізмів, що зв'язують імуноглобуліни. Це — протеїн G стрептококів та протеїн L *Peptostreptococcus magnus* [15]. Кожен із цих протеїнів зв'язує свій власний профіль імуноглобулінів, що дозволяє використовувати їх з різною метою. Також відомий штучно створений химерний протеїн A/G з молекулярною масою 50,46 кДа, що складається з чотирьох доменів протеїну А і двох доменів протеїну G. Цей протеїн поєднує імуноглобулін-зв'язувальні властивості протеїнів А та G, що розширює спектр його специфічності до різних класів імуноглобулінів [16].

Принципово новим напрямом у біотехнології є створення афінних конструкцій (афібоді) на основі протеїну А сайтспрямованим мутагенезом та відбором найбільш афінних варіантів за допомогою фагового дисплея [17]. Наприклад, на основі Z-домену було створено афібоді шляхом заміни 13 поверхневих амінокислот цього домену [18]. Застосування технології комбінаторної протеїнової інженерії для отримання реагентів з певною специфічністю розглядають як потужну альтернативу технології одержання рекомбінантних антитіл.

З огляду на вищезазначене можна зробити висновок, що отримання нових рекомбі-

нантних аналогів протеїну А *S. aureus* є перспективним напрямом сучасної біотехнології, який активно розвивається, відкриваючи нові можливості застосування подібних аналогів як у прикладній, так і в фундаментальній сфері. Тому метою даної роботи було одержати фрагмент стафілококового протеїну А з унікальною послідовністю, перевірити його функціональну активність і специфічність до імуноглобулінів різних видів ссавців порівняно з природним протеїном А, а також можливість використовувати отриманий рекомбінантний протеїн у складі кон'югатів в імуноензимному та імунохроматографічному тестуванні.

Матеріали і методи

Одержання рекомбінантного фрагмента протеїну А *S. aureus*. Нуклеотидну послідовність, що кодує необхідний фрагмент протеїну А, було ампліфіковано з геномної ДНК ізоляту золотистого стафілокока (ізолят не ідентифікували на належність до штаму). Для виділення стафілококів матеріал із мазків горла, взятих в авторів статті, висівали на селективно-диференційне середовище — жовтково-сольовий агар Г. Н. Чистовича (поживний агар, що містить 10% NaCl, до якого додавали 20% жовткової суспензії). Для відбору бактерій-носіїв гена протеїну А колонії, що вирости, тестували в ПЛР-аналізі на наявність продуктів відповідного розміру.

Для ампліфікації нуклеотидної послідовності, що кодує фрагмент протеїну А, використовували пару олігонуклеотидних праймерів з роботи Gomez et al. [4], у послідовність яких додали сайти для ендонуклеаз рестрикції *Bam*HI та *Xho*I. ПЛР-ампліфікацію проводили на термоциклері 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США) з використанням реактивів виробництва Fermentas (Литва) за режиму 95 °C 3 хв, 30 циклів (95 °C 1 хв, 51,5 °C 1 хв, 72 °C 2 хв) 72 °C 7 хв.

Одержаний ПЛР-продукт гідролізували ендонуклеазами рестрикції *Bam*HI та *Xho*I та клонували у векторі pET-28c(+) (Novagen, США). Такою рекомбінантною конструкцією трансформували клітини *E. coli* DH10B. Із отриманих після трансформації клонів методом лужного лізису виділяли плазмиду [19] і проводили рестрикційний аналіз. Для цього зразки плазмід гідролізували ендонуклеазами рестрикції *Bam*HI і *Xho*I та аналізували отримані фрагменти в 1,0% -му агарозному гелі у трис-ацетатно-

му буфері, рН 7,6 (40 мМ трис-оксиметиламінометан, 1 мМ ЕДТА). Із клону, що містить фрагмент, який відповідає цільовій послідовності, виділяли плазмиду і трансформували клітини *E. coli* Rosetta (ДЕЗ) (Novagen, США) методом електропорації, використовуючи близько 25 нг ДНК, за напруги 1800 V, на приладі Electroporator 2510 (Eppendorf, ФРН). Потім клітини переносили в 1 мл середовища SOC (без селективного антибіотика) та інкубували протягом 1 год при 37 °C, перемішуючи зі швидкістю 225 об/хв. Після цього їх висівали на чашки Петрі з твердим живильним середовищем 2YT, що містило селективний антибіотик канаміцин (середовища SOC та 2YT готували згідно з [19]). Секвенування нуклеотидної послідовності отриманого фрагмента проводили в Українській лабораторії якості і безпеки продукції агропромислового комплексу.

Отримані клони аналізували на наявність продукту в клітинних лізатах методом електрофорезу в 10% -му ПААГ у присутності SDS [20] та методом імуноблотингу.

Клітини штаму-продуцента нарощували при 37 °C на живильному середовищі 2YT з додаванням селективного антибіотика (канаміцину) до А600 = 0,5–1,0, після чого вносили індуктор експресії — IPTG (ізопропіл-β-D-тіо-галактопіранозид) до концентрації 1 мМ та ще 4 год при 30 °C. Після цього клітинну біомасу осаджували центрифугуванням (3 000 об/хв), осад ресуспендували в буфері, що містив 10 мМ Tris-HCl (рН 7,5), 2,5 мМ MgCl₂, 0,1 мМ CaCl₂, 100 мкг/мл лізоциму, 10 од/мл ДНК-ази й інкубували протягом 30 хв при 0 °C. Після цього зразки обробляли ультразвуковим дезінтегратором Labsonic (Sartorius, ФРН). Фракцію розчинних протеїнів, що містила цільовий продукт, відокремлювали від нерозчинної центрифугуванням (7 500–8 500 г).

Імуноблотинг проводили шляхом електроперенесення протеїнів із гелю на нітроцелюлозну мембрану на приладі Hoefer™ TE77. Потім мембрану вміщували в 5% -й розчин знежиреного молока в ЗФР (0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,144% Na₂HPO₄, 0,024% KH₂PO₄, рН 7,4) та інкубували при 4 °C упродовж ночі. Після цього мембрану промивали і занурювали у розчин кон'югованих з пероксидазою антитіл проти полігістидинової маркерної послідовності. Антитіла (Sigma, США) вносили в ЗФР, що містив 0,04% Твін-20, та інкубували 1 год при 37 °C, після чого промивали. Для візуалізації результатів нітроцелюлозну мембрану переносили в 0,06% -й розчин діамінобензидину, який містив 0,003% пероксиду водню.

Рекомбінантний фрагмент протеїну А виділяли методом металоафінної хроматографії на сорбенті Ni-NTA агароза (Sigma, США) у нативних умовах. Сорбент врівноважували, відмиваючи двічі дистильованою водою та один раз буфером для відмивання (50 мМ Na₂HPO₄, 0,5 М NaCl, рН 8,0) з розрахунку 1,5 мл на 50 мкл сорбенту. Клітини штаму-продуцента нарощували, індукували експресію, після чого осаджували центрифугуванням 15 хв зі швидкістю 3 000 об/хв. До осаду додавали буфер для лізису (50 мМ Na₂HPO₄, 0,3 М NaCl, 100 мкг/мл лізоциму, 10 од/мл ДНК-ази, рН 8,0) з розрахунку 1 мл буфера на 20 мл клітинної суспензії та інкубували 30 хв при 0 °С. Після цього суміш обробляли ультразвуковим дезінтегратором і видаляли нерозчинні залишки осадженням 15 хв, 8 500 г. Надосадову рідину додавали до врівноваженого сорбенту (з розрахунку 1 мл на 50 мкл сорбенту) і залишали на 1 год при 30 °С, періодично перемішуючи. Потім сорбент зі зв'язаним протеїном тричі промивали буфером для відмивання, двічі буфером для відмивання з 10 мМ імідазолом та елюювали протеїн буфером для елюції (20 мМ Tris-HCl (рН 7,5), 100 мМ NaCl, 350 мМ імідазол).

Для визначення концентрації протеїну використовували метод Бредфорда [21], проби аналізували електрофорезом у 10% ПААГ.

Синтез кон'югатів рекомбінантного та природного протеїнів А з пероксидазою хрону проводили за допомогою періодатного методу за методикою Nakane [22]. Разом з рекомбінантним фрагментом для синтезу кон'югата було використано препарат природного протеїну А («Предприятие по производству бакпрепаратов НИИЭМ им. Пастера», Росія).

До 1 мл розчину пероксидази хрону в дистильованій воді (4 мг/мл) додавали 200 мкл розчину періодату натрію (21,4 мг/мл) та інкубували при кімнатній температурі протягом 20 хв за постійного перемішування. Після цього реакційну суміш ставили на діаліз на 12 год при 4 °С проти ацетатного буфера, 1 л якого містив 136 мг тригідрату ацетату натрію та 39,7 мкл 99,6% оцтової кислоти (рН 4,4). До 0,5 мл активованої пероксидази в ацетатному буфері за постійного перемішування додавали 20 мкл натрійкарбонатного буфера, 1 л якого містив 6,48 г Na₂CO₃ і 11,76 г NaHCO₃ (рН 9,5), потім додавали 250 мкл розчину протеїну А в натрійкарбонатному буфері (4 мг/мл) і перемішували при кімнатній температурі упродовж 2 год. Після цього в реакційну суміш дода-

вали 50 мкл розчину NaBH₄ в дистильованій воді (4 мг/мл) і перемішували протягом 2 год при 4 °С. Отримані кон'югати очищували шляхом висолювання насиченим розчином сульфату амонію [22].

Дослідження імуноглобулінзв'язувальних властивостей кон'югатів протеїнів А з пероксидазою хрону проводили за допомогою імуноензимного аналізу [23]. Як антигени використовували препарати, що містили імуноглобуліни 10 різних видів ссавців (людини, миші, кроля, мурчака, свині, корови, вівці, кози, віслюка та коня).

Синтез кон'югата рекомбінантного фрагмента протеїну А S. aureus з колоїдним золотом. До 50 мкл 1%-го водного розчину золотохлорводневої кислоти додавали 737,5 мкл дистильованої води, нагрівали до 60 °С та змішували з нагрітим до 60 °С буфером, що містив 200 мкл 1%-го розчину цитрату натрію, 7,5 мкл 0,03%-го водного розчину танінової кислоти та 5 мкл 1%-го розчину K₂CO₃. Суміш інкубувати 20 хв при 60 °С, після чого швидко охолоджували до 0 °С та додавали 25 мкг рекомбінантного фрагмента протеїну А. Через 40 хв додавали сироватковий альбумін бика (БСА) до кінцевої концентрації 5% та інкубували ще 40 хв. Після інкубації суміш центрифугували 1 год (8 500 г, 0 °С), видаляли надосадову рідину, а осад ресуспендували у 0,2%-му розчині цитрату натрію, що містив 50 мг/мл БСА. У такому вигляді кон'югат зберігали при 4 °С.

Оптичне поглинання отриманого кон'югата вимірювали на спектрофотометрі СФ-2000 (ОКБ «Спектр», Росія).

Проведення імунохроматографічного аналізу. Для імунохроматографічного аналізу було використано нітроцелюлозні мембрани Hi-Flow та набір для комплектації тест-систем Hi-Flow™ Plus Assembly Kit Plus (Millipore, США). До складу стрипу, окрім нітроцелюлозної мембрани з іммобілізованими імуноглобулінами, входила також смужка для кон'югата колоїдного золота з протеїном А, та смужка, що вбирає надлишок вологи під час руху проби і кон'югата в товщі мембрани. Використовували нітроцелюлозну мембрану розміром 5x30 мм. На смужку для кон'югата наносили 5 мкл розчину кон'югата колоїдного золота та висушували. Сироватки (в розведенні 1:100 у ЗФР) чи контрольний антиген (в концентрації 1 мг/мл) наносили тонкою смугою, 30 хв витримували мембрану при 37 °С, після цього протягом 30 хв — у 5%-му розчині знежиреного молока в ЗФР, потім промивали та висушували. До нітроцелюлозної мембрани

прикріплювали з одного боку смужку для кон'югата, з другого — адсорбуючу смужку таким чином, щоб вони на кілька міліметрів покривали нітроцелюлозну мембрану, після цього смужку для кон'югата покривали фільтрувальним папером. Для проведення аналізу стрип занурювали у фізрозчин так, щоб у рідині знаходився лише фільтрувальний папір, і за 10 хв реєстрували наявність червоної смуги, що з'являється внаслідок взаємодії між Fc-фрагментами антитіл, іммобілізованих на мембрані, та кон'югованими з наночастками золота рекомбінантними фрагментами протеїну А, які рухаються в товщі мембрани.

Так само проводили аналіз для перевірки можливості візуалізувати отриманим кон'югатом комплекси антиген-антитіло. На нітроцелюлозну мембрану наносили смугу антигену (рекомбінантну субодиницю В дифтерійного токсину) у концентрації 1 мг/мл, а імунну мишачу сироватку (5 мкл) — безпосередньо на смужку фільтрувального паперу і занурювали стрип у фізрозчин. Під час проведення аналізу антитіла мишачої сироватки зв'язуються із фрагментом протеїну А, кон'югованим з наночастинками золота, і, рухаючись у товщі мембрани, взаємодіють з антигеном, внаслідок чого на нітроцелюлозі проявляється червона смуга. Додатково на нітроцелюлозну мембрану було нанесено контрольну смугу (сироватки в розведенні 1:100) як контроль роботи кон'югата.

Результати та обговорення

Протеїн А *S. aureus* складається з п'яти доменів: D, E, A, B і C, кожен з яких має здатність зв'язуватись із Fc-фрагментом антитіл (як правило, IgM та IgG) багатьох видів тварин і людини [24]. Також кожен домен SPA здатен взаємодіяти з Fab-фрагментами антитіл (IgM, IgA, IgG і IgE), що містять V_{H3} домен важкого ланцюга [25, 26]. Кожен з п'яти доменів SPA має послідовність приблизно з 56–61 амінокислотних залишків, які утворюють структуру, що складається з трьох антипаралельних альфа-спіралей. За допомогою рентгеноструктурного аналізу було показано, що в структурі B-домену 11 амінокислотних залишків першої та другої альфа-спіралі беруть участь у зв'язуванні з Fc-фрагментом IgG [27]. Водночас за зв'язування з Fab-фрагментом антитіл відповідають інші 11 залишків, що належать другій та третій альфа-спіралям [28]. Зв'язок між антитілом та кожним до-

меном протеїну А досить міцний: за фізіологічних умов константа афінності становить близько 10^8 M^{-1} [29, 30]. Протеїн А з високою афінністю зв'язує IgG1 та IgG2 людини і IgG2a та IgG2b миші; із середньою афінністю — IgM, IgA та IgE людини й IgG3 та IgG1 миші і майже не реагує з IgG3 та IgD людини і IgM, IgA та IgE миші [31].

З метою отримання рекомбінантного фрагмента протеїну А, який би максимально відповідав імуноглобулінзв'язувальним властивостям природного SPA, ми клонували послідовність, що кодує чотири специфічні до Fc-фрагмента антитіл домену протеїну А: E-, D-, A- та B-домени. Ці домени є гомологічними, і тому праймер, специфічний до нуклеотидної послідовності одного домену, може взаємодіяти з послідовностями, які кодують інші домени, що ускладнює процедуру їх ампліфікації. Так у роботі Gomez і співавт. [4] для ампліфікації окремих доменів матричну ДНК перед ампліфікацією обробляли ендонуклеазами рестрикції для запобігання перехресному реагуванню праймерів. Для отримання необхідного фрагмента ДНК продукти полімеразної ланцюгової реакції ми розділяли за допомогою електрофорезу в 1%-му агарозному гелі та виділяли фрагмент необхідного розміру.

Не всі виділені колонії, що їх використовували для отримання ДНК-матриці, несли ген протеїну А (на рис. 1 показано лише частину проб). Довжина очікуваного фрагмента становила 718 п. н., відповідно для подальшої роботи було виділено фрагмент близько 700 п. н. Подальше секвенування клонованої ДНК-послідовності показало, що вона відповідає передбачуваній (рис. 2, А). Максимальна ідентичність, порівняно з окремими ізолятами золотистого стафілокока дорівнювала 96%.

Було проведено порівняння клонованого фрагмента протеїну А та відомих з літератури амінокислотних послідовностей протеїну А, виділених зі *S. aureus*, з використанням пошукової системи амінокислотних послідовностей NIH Protein BLAST. Виявлено, що клонована послідовність доменів E-D-A-A* протеїну А відповідає описанам раніше [24] його фрагментам його (рис. 2, А), окрім домену A*, послідовність якого не мала повної гомології ні з B- (різниця 4 амінокислоти), ні з A-доменом (різниця 2 амінокислоти) описаної послідовності. Під час додаткового BLAST-аналізу встановили, що отриманий A*-домен є найбільш гомологічним до A-домена (різниця 1 амінокислота) протеїну А *S. aureus* штаму V8 (рис. 2, B)

[32]. Таким чином, клонований фрагмент протеїну А має унікальну доменну послідовність E-D-A-A*.

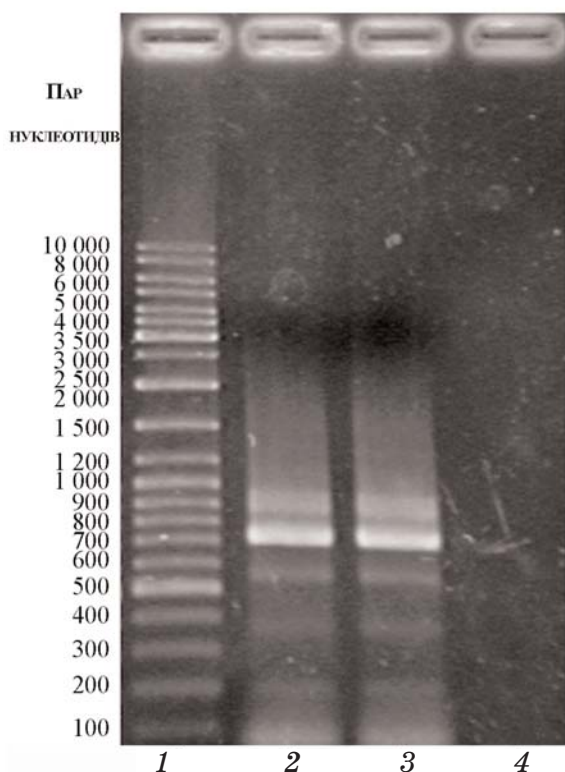


Рис. 1. ПЛР-ампліфікація послідовності, що кодує фрагмент протеїну А:
1 — маркери; 2, 3, 4 — зразки, отримані з використанням матриці ДНК, виділеної з різних колоній золотистого стафілокока

Відсутність у структурі одержаного рекомбінантного протеїну очікуваної послідовності домену В свідчить про унікальність виділеного ізоляту стафілокока. Крім того, можна припустити наявність особливих імунобіологічних властивостей у синтезованого цим штамом відповідного фактора патогенності. У літературі поки що нема даних про існування стафілококів з аналогічною послідовністю доменів протеїну А, а отже відсутні дані й про їх патогенний вплив, що вказує на необхідність подальшого вивчення цього питання. З іншого боку, унікальність отриманої послідовності рекомбінантного фрагмента протеїну А стафілокока дає підстави прогнозувати можливість його використання для створення імуноафінних сорбентів для виділення імуноглобулінів у «пом'якшених» умовах, оскільки в структурі фрагмента відсутній найбільш афінний стосовно Fc-фрагментів IgG домен В [33].

Імуноблотинг з антитілами проти гістидинового тагу підтвердив наявність у клітинному лізаті рекомбінантного протеїну з розрахованою за допомогою програми Vector NTI 10 масою — близько 28 кДа (рис. 3, В). Аналіз розчинної та нерозчинної білкових фракцій клітин штаму-продуцента виявив, що цільовий протеїн синтезується переважно у розчинному вигляді. Відповідно, процедуру очищення проводили без додавання денатуруючих агентів (з використанням металоафінної хроматографії). На рис. 3, А наведено електрофореграму зразків різних фракцій виділеного продукту.

На наступному етапі здійснено порівняльні дослідження імуноглобулінів'язувальних властивостей природного та отриманого нами рекомбінантного протеїнів А. За допомогою періодатного методу синтезували два кон'югати цих протеїнів А з пероксидазою хрому та перевірили в імуноензимному аналізі їхню активність і специфічність до імуноглобулінів 10 видів ссавців: людини, миші, кроля, мурчака, свині, корови, вівці, кози, віслюка та коня. Результати цих досліджень (рис. 4) показали, що за своїми властивостями щодо розпізнавання імуноглобулінів перерахованих вище видів тварин і людини отриманий нами рекомбінантний протеїн А є абсолютним аналогом природного протеїну А *S. aureus* (коефіцієнт кореляції $R = 0,979$), і його можна використовувати у складі імунохімічних кон'югатів та хроматографічних сорбентів для виявлення або виділення імуноглобулінів.

Для перевірки здатності рекомбінантного фрагмента протеїну А виявляти імуноглобуліни в хроматографічному латеральному імуноаналізі проводили його кон'югацію з наночастками колоїдного золота.

Синтез колоїдного золота здійснювали за стандартною методикою відновлення тетрахлориду золота натрійцитратом [34], проте дослідним шляхом було розроблено низку модифікацій для оптимізації цієї процедури. Вносячи різну кількість протеїну А, визначили його оптимальну концентрацію, яка становила 25 мкг/мл суспензії колоїдного золота (протеїн вносили у 20мМ Tris-HCl буфері, рН 7,5). Розмір колоїдних частинок золота, що їх використовували для синтезу кон'югата, визначали вимірюванням оптичного поглинання. Як видно з рис. 5, на графіку є максимум 524 нм, що відповідає поглинанню колоїдного золота з розміром частинок близько 40 нм [35].

Функціональну активність отриманого рекомбінантного фрагмента протеїну А

		Домен D		
A	rSPA: 1	AAQHD	EAQQNAFYV	LNMPNLNADQ
	SPA MW2: 35	AAQHD	EAQQNAFYV	LNMPNLNADQ
		Домен E		
	rSPA: 61	ADNNFN	KEQQNAFY	EILNMPNL
	SPA MW2: 95	AQQN	NFNKQQSA	FYEILNMP
		Домен A		
	rSPA: 120	DNNFN	KEQQNAFY	EILNMPNL
	SPA MW2: 155	DNNFN	KEQQNAFY	EILNMPNL
		Домен B (A*)		
	rSPA: 180	FNKE	QQNAFY	EILNMPNL
	SPA MW2: 215	FNKE	QQNAFY	EILNMPNL
		Домен A		
B	rSPA: 177	ADNNFN	KEQQNAFY	EILNMPNL
	SPA MW2: 154	ADNNFN	KEQQNAFY	EILNMPNL
	SPA V8: 166	ADNNFN	KEQQNAFY	EILNMPNL

Рис. 2. Порівняння амінокислотних послідовностей протеїнів А різного походження з використанням пошукової системи амінокислотних послідовностей NIH Protein BLAST:

- A — порівняння послідовності отриманого фрагмента протеїну А (rSPA) з найбільш подібною послідовністю протеїну А штаму *S. aureus* MW2 (SPA MW2). Сірим кольором позначено залишки, що відрізняються у порівнюваних послідовностей;
- B — порівняння послідовностей доменів А SPA, отриманих з *S. aureus* штамів MW2 (SPA MW2) та V8 (SPA V8) з С-кінцевим доменом фрагмента рекомбінантного протеїну А (rSPA). Червоним кольором позначено залишки, що відрізняються порівняно з послідовністю С-кінцевого домену одержаного фрагмента протеїну А (rSPA)

перевіряли методом імунохроматографії. На нітроцелюлозну мембрану наносили антитіла різних видів ссавців та людини, а також контрольний антиген (рекомбінантну субодиницю В дифтерійного токсину), з яким кон'югат не реагуватиме (рис. 6). Як видно з рис. 6, отриманий кон'югат прояв-

ляє смугу антитіл і не реагує з контрольним антигеном. Ці результати підтверджують, що оптимізована нами методика синтезу колоїдного золота та його кон'югації з фрагментом протеїну А є ефективною, а отриманий рекомбінантний аналог протеїну А — функціонально активний. Під час зберігання кон'югат залишався функціонально активним принаймні упродовж 7 міс.

Ми також перевірили, чи можна застосовувати цей кон'югат безпосередньо для візу-

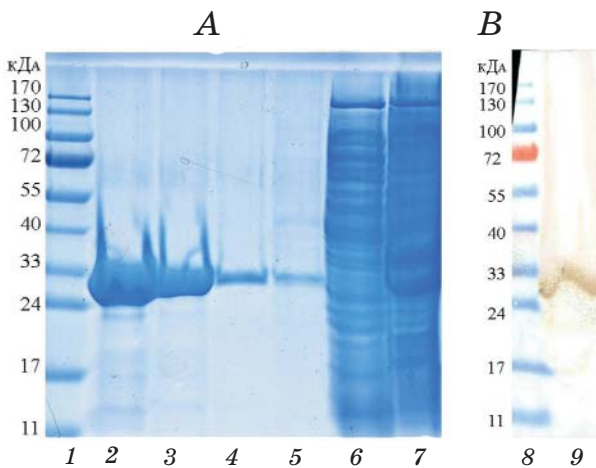


Рис. 3. Виділення (A) та ідентифікація наявності (B) рекомбінантного фрагмента протеїну А:

- 1, 8 — маркери молекулярної маси, 2, 3, 4, 5 — різні фракції виділеного продукту, 6 — матеріал, що не зв'язався з сорбентом, 7 — клітинний лізат із цільовим протеїном, 9 — імуноблотинг клітинного лізату із цільовим протеїном

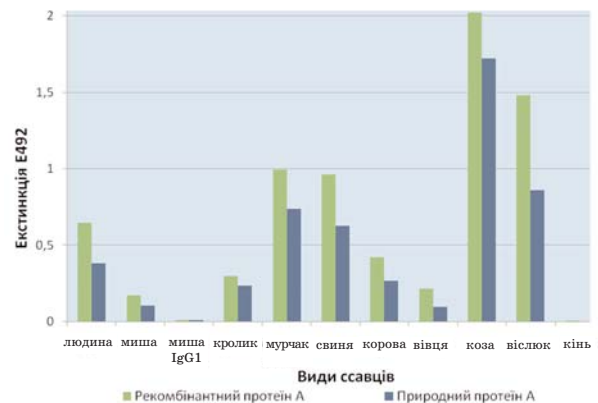


Рис. 4. Результати порівняльного імуноензимного аналізу здатності рекомбінантного і природного протеїнів А до взаємодії з імуноглобулінами ряду видів ссавців у складі кон'югатів з пероксидазою хрому



Рис. 5. Спектр оптичного поглинання колоїдного золота, що використовувалося для кон'югації з фрагментом протеїну А

алізації комплексів антиген-антитіло в непрямому імунохроматографічному аналізі. На рис. 6, В наведено результати експерименту, в якому на нітроцелюлозну мембрану наносили антиген (субодиницю В дифтерійного токсину), а сироватку імунізованої цим антигеном тварини додавали під час проведення аналізу. Як видно з рисунка, на нітроцелюлозі проявилася смуга антигену та контрольна смуга (імуноглобуліни кроля). Це підтверджує, що одержаний нами кон'югат можна використовувати для розроблення імунохроматографічних тест-систем у форматі непрямого аналізу для виявлення специфічних антитіл у сироватці крові, коли на нітроцелюлозній мембрані іммобілізовано відповідний антиген.

Таким чином, отримано новий рекомбінантний аналог протеїну А *Staphylococcus aureus* масою близько 28 кДа, що містить чотири імуноглобулінзв'язувальні домени. Аналіз секвенсованої нуклеотидної послідовності цього аналога показав, що протеїн має унікальну послідовність доменів E-D-A-A*. Створення на основі одержаного фрагмента протеїну А кон'югатів з пероксидазою хрому та колоїдним золотом уможливило перевірку його функціональної активності стосовно імуноглобулінів різних видів ссавців.

ЛІТЕРАТУРА

1. Schneewind O., Model P., Fischetti V. A. Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall // Cell. — 1992. — V. 70, N2. — P. 267–281.
2. Schneewind O., Fowler A., Faull K. F. Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus* // Science. — 1995. — V. 268, N5207. — P. 103–106.
3. Foster T. J. Immune evasion by staphylococci // Nat. Rev. Microbiol. — 2005. — V. 3, N12. — P. 948–958.

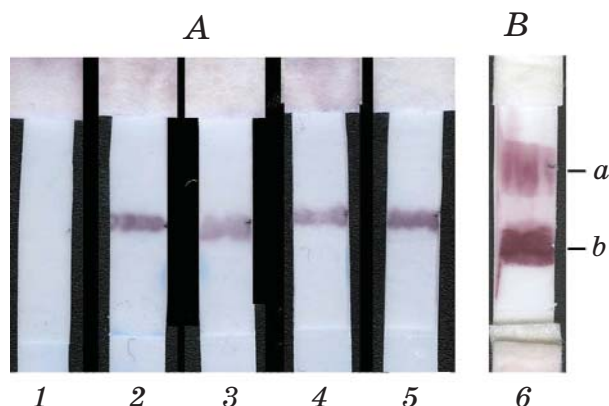


Рис. 6. Імунохроматографічний аналіз з використанням отриманого кон'югата.

На нітроцелюлозі іммобілізовано:

- 1 — контрольний антиген (рекомбінантну субодиницю В дифтерійного токсину);
 - 2 — сироватку крові корови;
 - 3 — сироватку крові кроля;
 - 4 — сироватку крові миші;
 - 5 — сироватку крові людини;
 - 6 — виявлення антитіл, специфічних до субодиниці В дифтерійного токсину в сироватці крові імунізованої миші;
- a — контрольна смуга (імуноглобуліни кроля);
b — смуга субодиниці В

Результати імуноензимного та імунохроматографічного аналізів показали повну відповідність властивостей рекомбінантного та природного протеїнів А, що підтвердило можливість використання рекомбінантного протеїну для виявлення антитіл в імуноензимних тест-системах, імунохроматографічних швидких тестах, а також у складі афінних сорбентів для виділення імуноглобулінів. Імовірно, відсутність у складі отриманого рекомбінантного аналога протеїну А високоафінного В-домену дозволить у майбутньому використовувати його для створення афінного сорбенту з метою виділення імуноглобулінів у «м'яких» умовах.

4. Gomez M. I., O'Seaghdha M., Magargee M. et al. *Staphylococcus aureus* protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains // J. Biol. Chem. — 2006. — V. 281, N29. — P. 20190–20196.
5. O'Seaghdha M., van Schooten C. J., Kerrigan S. W. et al. *Staphylococcus aureus* protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions // FEBS J. — 2006. — V. 273, N21. — P. 4831–4841.
6. Silverman G. J., Goodyear C. S., Siegel D. L. On the mechanism of staphylococcal protein A

- immunomodulation // *Transfusion*. — 2005. — V. 45, N2. — P. 274–280.
7. Palmqvist N., Silverman G. J., Josefsson E., Tarkowski A. Bacterial cell wall-expressed protein A triggers supraclonal B-cell responses upon *in vivo* infection with *Staphylococcus aureus* // *Microb. Infect.* — 2005. — V. 7, N15. — P. 1501–1511.
 8. Hober S., Nord K., Linhult M. Protein A chromatography for antibody purification // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* — 2007. — V. 848, N1. — P. 40–47.
 9. Shpigel E., Goldlust A., Eshel A. et al. Expression, purification and applications of staphylococcal protein A fused to cellulose-binding domain // *Biotechnol. Appl. Biochem.* — 2000. — V. 31, Pt. 3. — P. 197–203.
 10. Nilsson B., Moks T., Jansson B. et al. Synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A // *Prot. Eng.* — 1987. — V. 1, N2. — P. 107–113.
 11. Moks T., Abrahmsun L., Holmgren E. et al. Expression of human insulin-like growth factor I in bacteria: use of optimized gene fusion vectors to facilitate protein purification // *Biochemistry.* — 1987. — V. 26, N17. — P. 5239–5244.
 12. Ljungquist C., Jansson B., Moks T., Uhlen M. Thiol-directed immobilization of recombinant IgG-binding receptors // *Eur. J. Biochem.* — 1989. — V. 186, N3. — P. 557–561.
 13. Inouye S., Sahara Y. Soluble protein expression in *E. coli* cells using IgG-binding domain of protein A as a solubilizing partner in the cold induced system // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2008. — V. 376, N3. — P. 448–453.
 14. Gulich S., Uhlen M., Hober S. Protein engineering of an IgG-binding domain allows milder elution conditions during affinity chromatography // *J. Biotechnol.* — 2000. — V. 76, N2–3. — P. 233–244.
 15. Housden N. G., Harrison S., Roberts S. E. et al. Immunoglobulin-binding domains: Protein L from *Peptostreptococcus magnus* // *Biochem. Soc. Trans.* — 2003. — V. 31, Pt. 3. — P. 716–718.
 16. Eliasson M., Olsson A., Palmcrantz E. et al. Chimeric IgG-binding receptors engineered from staphylococcal protein A and streptococcal protein G // *J. Biol. Chem.* — 1988. — V. 263, N9. — P. 4323–4327.
 17. Kushwaha A., Chowdhury P. S., Arora K. et al. Construction and characterization of M13 bacteriophages displaying functional IgG-binding domains of staphylococcal protein A // *Gene.* — 1994. — V. 151, N1–2. — P. 45–51.
 18. Nord K., Gunneriusson E., Ringdahl J., Stahl S. et al. Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain // *Nat. Biotechnol.* — 1997. — V. 15, N8. — P. 772–777.
 19. Sambrook J., Fritsch E. F. *Molecular cloning: A laboratory Manual*, Second edition — NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. — 999 p.
 20. Schagger H., von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa // *Anal. Biochem.* — 1987. — V. 166. — P. 368–379.
 21. Bradford, M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Ibid.* — 1976. — V. 72. — P. 248–254.
 22. Harlow E., Lane D. *Antibodies: a laboratory manual* — N.-Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. — 726 p.
 23. Теория и практика иммуноферментного анализа / Егоров А. М., Осипов А. П., Дзантиев Б. Б., Гаврилова Е. М. — М.: Высшая школа, 1991. — 288 с.
 24. Uhlen M., Guss B., Nilsson B. et al. Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A // *J. Biol. Chem.* — 1984. — V. 259, N3. — P. 1695–1702.
 25. Sasso E. H., Silverman G. J., Mannik M. Human IgA and IgG F(ab')₂ that bind to staphylococcal protein A belong to the VHIII subgroup // *J. Immunol.* — 1991. — V. 147, N6. — P. 1877–1883.
 26. Jansson B., Uhlen M., Nygren P. A. All individual domains of staphylococcal protein A show Fab binding // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* — 1998. — V. 20, N1. — P. 69–78.
 27. Deisenhofer J. Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution // *Biochemistry.* — 1981. — V. 20, N9. — P. 2361–2370.
 28. Graille M., Stura E. A., Corper A. L. et al. Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2000. — V. 97, N10. — P. 5399–5404.
 29. *Handbook of Affinity Chromatography*, Second Edition. Edited by D. S. Hage. Taylor & Francis, Inc., 2005. — 968 p.
 30. Jendeborg L., Nilsson P., Larsson A. et al. Engineering of Fc(1) and Fc(3) from human immunoglobulin G to analyse subclass specificity for staphylococcal protein A // *J. Immunol. Methods.* — 1997. — V. 201, N1. — P. 25–34.
 31. Kabir S. Immunoglobulin purification by affinity chromatography using protein A mimetic ligands prepared by combinatorial chemical synthesis // *Immunol Invest.* — 2002. — V. 31, N3–4. — P. 263–278.

32. *Finck-Barbancon V., Prevost G., Mazurier I., Piemont Y.* A structurally novel staphylococcal protein A from the V8 strain // *FEMS Microbiol. Lett.* — 1992. — V. 70, N1. — P. 1–8.
33. *Huang F., Lerner E., Sato S. et al.* Time-resolved fluorescence resonance energy transfer study shows a compact denatured state of the B domain of protein A // *Biochemistry.* — 2009. — V. 48, N 15. — P. 3468–3476.
34. *Frens G.* Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspension // *Nat. Phys. Sci.* — 1973. — V. 241. — P. 20–21.
35. *Алимарин И. П., Фадеева В. И., Дорохова Е. Н.* Демонстрационный эксперимент по общему курсу аналитической химии. — М: Химия, 1974. — 286 с.

**КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ
ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНОГО
ФРАГМЕНТА D-E-A-A* ПРОТЕИНА А
*Staphylococcus aureus***

*Е. С. Олейник
Д. В. Колибо
А. А. Кабернюк
А. Ю. Лабинцев
Н. В. Короткевич
С. И. Романюк
С. В. Комисаренко*

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

E-mail: kolibo@biochem.kiev.ua

Получен рекомбинантный фрагмент протеина А *Staphylococcus aureus* с уникальной последовательностью, состоящий из четырех доменов: D–E–A–A* и экспрессирующийся в клетках *Escherichia coli*. С целью проверки функциональной активности были протестированы его иммуноглобулинсвязывающие свойства с использованием конъюгат этого рекомбинантного фрагмента с пероксидазой хрена и наночастицами коллоидного золота.

Показано, что рекомбинантный фрагмент протеина А, меченный пероксидазой хрена или коллоидным золотом, обладает такой же специфичностью по отношению к иммуноглобулинам млекопитающих, как и природный протеин А. Таким образом, полученный аналог протеина А можно использовать при создании хроматографических сорбентов для выделения иммуноглобулинов и иммунохимических конъюгат для выявления антител, а также в дальнейших фундаментальных исследованиях иммунобиологических свойств протеина А.

Ключевые слова: протеин А, *Staphylococcus aureus*, рекомбинантный аналог, иммуноглобулинсвязывающая активность, иммуноэнтзимный анализ, иммунохроматографические тесты.

**CLONNING AND EXPRESSION
OF FUNCTIONAL FRAGMENT D-E-A-A*
OF PROTEIN A FROM
*Staphylococcus aureus***

*O. S. Oliynyk
D. V. Kolibo
A. A. Kaberniuk
A. Yu. Labyntsev
N. V. Korotkevich
S. I. Romanyuk
S. V. Komisarenko*

Palladin Institute of Biochemmistry
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: kolibo@biochem.kiev.ua

Recombinant fragment of protein A from *Staphylococcus aureus* with unique sequence, which has four domains D–E–A–A* and is expressed in *Escherichia coli* have been obtained. Conjugates of recombinant fragment with horse radish peroxidase and colloidal gold nanoparticles were used for testing its functional activity and immunoglobulin-binding properties.

It was shown, that recombinant fragment of protein A marked by horseradish peroxidase or colloidal gold nanoparticles, has the same specificity to mammal immunoglobulines as native protein A. Therefore an obtained analog of protein A can be used not only in development of chromatography sorbents for immunoglobulins purification and immunochemical conjugates for immunoglobulins detection, but also in fundamental investigations of immunobiological properties of protein A.

Key words: protein A, *Staphylococcus aureus*, recombinant analog, immunoglobulin-binding activity, immunoenzyme assay, immunochromatography tests.