

УДК 573.6.086.83:577.21]:[615.373.3+615.277]

ОЧИСТКА ХИМЕРНОГО БЕЛКА АЛЬБУРОНА16 ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ ДРОЖЖЕЙ *Pichia pastoris*

© 2012 г. А. В. Карабельский, М. В. Падкина

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034

e-mail: karabelsky@gmail.com

Поступила в редакцию 10.10.2011 г.

Разработаны условия выделения химерного белка Альбурона16 (альбумин-интерферон-альфа 16 человека) из культуральной среды дрожжей *Pichia pastoris*, при которых не происходит агрегации белка и сохраняется его биологическая активность. Предложенная схема может быть использована для выделения и очистки химерного белка в лабораторных условиях. Полученные результаты могут быть полезны для усовершенствования способов очистки различных рекомбинантных белков, синтезируемых и секретируемых дрожжами *P. pastoris*.

Быстрое развитие биотехнологии способствовало созданию множества систем гетерологичной экспрессии, позволяющих получать различные эукариотические белки с заданными свойствами в количествах, достаточных для их успешного применения как в научной работе, так и в медицинской практике [1, 2]. Поскольку большую часть биотехнологических лекарственных средств представляют белковые молекулы, то необходимым условием их применения является сохранение биологической активности и максимально возможная очистка препарата от примесных белков, которые могут вызвать нежелательные побочные эффекты.

Использование продуцентов, секретирующих рекомбинантные белки, существенно упрощает их очистку. Ранее в лаборатории биохимической генетики кафедры генетики и селекции СПбГУ был получен штамм дрожжей *P. pastoris*, секретирующий в культуральную среду биологически активный гибридный рекомбинантный белок Альбурон16 (86 кДа), состоящий из альбумина человека и лейкоцитарного интерферона- α 16 [3].

Цель исследования – разработка методов, позволяющих получать биологически активный препарат Альбурона16 из культуральной среды дрожжей, как в лабораторных, так и в промышленных масштабах.

МЕТОДИКА

Штамм дрожжей *Pichia pastoris* GS115AbN16 [4] был создан на основе штамма дрожжей *Pichia pastoris* GS115 (“Invitrogen”, США). Фенотип штамма: His⁺Mut^s, His⁻, His⁺ – ауксотрофность и прототрофность по гистидину, Mut^s – замедленная скорость роста на среде с метанолом по сравнению со штаммом дикого типа – Mut⁺.

Условия культивирования штаммов. Для выращивания дрожжей *P. pastoris* штамма GS115AbN16 использовали жидкие среды VMG и VMG2, содержащие (г/л дистиллированной воды): дрожжевой экстракт – 10.0; KH₂PO₄ – 3.75, K₂HPO₄ · 3H₂O – 12.0, MgSO₄ · 7H₂O – 0.5, CaSO₄ · 2H₂O – 0.4, (NH₄)₂SO₄ – 3.0; (мг/л): FeSO₄ · 7H₂O – 16.25, CuSO₄ · 5H₂O – 1.5, ZnSO₄ · 7H₂O – 0.5, MnSO₄ · H₂O – 0.75; биотин – 50.0; глицерин – 10 мл; пептон – 20.0 г (только в среде VMG).

Для индукции экспрессии гена, находящегося под контролем промотора гена *AOX1*, дрожжевые клетки переносили в среду BMM или BMM2, которые, в отличие от сред VMG и VMG2 соответственно, содержали в качестве источника углерода метанол в концентрации 0.5%.

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд [5].

Электрофорез белков в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (Na-ДДС) проводили по методу Лэммли [6]. Для определения молекулярной массы исследуемых белков в одну из лунок геля наносили пробу с маркерными белками (“Unstained molecular weight marker”, “Fermentas”, Литва): β -галактозидаза – 116.0 кДа; бычий сывороточный альбумин – 66.2 кДа; овальбумин – 45.0 кДа; лактатдегидрогеназа – 35.0 кДа; эндонуклеаза рестрикции *Bsp98I* – 25.0 кДа; β -лактоглобулин – 18.4 кДа; лизоцим – 14.4 кДа.

Для подтверждения того, что секретируемый белок размером 86 кДа является химерным белком Альбуроном16, проводили иммуноблоттинг с антителами к ИФН- α 2 и HSA по стандартной методике. Для анализа электрофореграмм использовали компьютерную программу “ImageJ1.32” (URL: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

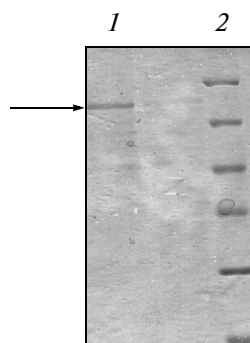


Рис. 1. Электрофореграмма белков после хроматографии на голубой сефарозе. 1 – элюция 1 М KSCN; 2 – маркеры молекулярной массы. Стрелкой отмечен химерный белок Альбурон16.

Гель-фильтрацию на Sephacryl S-200 (“GE Healthcare”, США) проводили в 20 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5.5 и 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7.0. Гель-фильтрацию на BioRad P-300 (“BioRad”, США) проводили в 20 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5.5; в отдельных экспериментах буфер дополнительно содержал 0.05% твин-20 или 0.05% ДДС. Гель-фильтрацию на сефадексе G-25 проводили в 50 мМ буфере трис-НСl, pH 7.5; фосфатном буфере, pH 6.5, и 50 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5.5. Хроматографию на голубой сефарозе Cibacron F3GA (“Polysciences”, Германия) проводили в 20 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5.5; белки элюировали последовательно 200 и 500 мМ KSCN в стартовом буфере и 50 мМ трис-НСl, pH 8.5.

Ионообменную хроматографию (ИОХ) на ДЭАЭЦ проводили в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7.0; элюцию химерного белка осуществляли 0.35 М NaCl в стартовом буфере. Хроматографию на фенол-сефарозе CL-4В проводили в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7.0, с добавлением сульфата аммония до конечной концентрации 1.5 М, после чего проводили ступенчатую элюцию белков 1.0 затем 0.5 М сульфатом аммония в стартовом буфере, стартовым буфером и 30%-ным изопропиловым спиртом (ИПС). Раствор с химерным белком после элюции с фенол-сефарозы диализовали против 20 мМ натрий-аце-

татного буфера, pH 5.5. Разделение белков на Sephacryl S-200 и BioRad P-300 проводили на колонках Spectra/Chrom® (2.5 см × 60 см). Объем пробы составлял 1/40–1/50 объема колонки, скорость потока 20 см/ч. Гель-фильтрацию на сефадексе G-25 проводили на колонке Spectra/Chrom® (1.5 см × 20 см), объем пробы составлял 1/5–1/6 объема колонки, скорость потока – 30 см/ч.

Хроматографию на голубой сефарозе проводили на колонке Spectra/Chrom® (0.6 × 15 см), скорость потока – 5 см/ч. Хроматографию на фенол-сефарозе CL-4В проводили на колонке Spectra/Chrom® (0.6 × 15 см), скорость потока – 30 см/ч. ИОХ проводили на колонке Spectra/Chrom (5 × 30 см), скорость потока – 20 см/ч. Биологическую активность Альбурона16 определяли по подавлению цитопатической активности вируса ветряночного стоматита в первичной культуре L-41 кожно-мышечной ткани эмбрионов человека, чувствительной к ИНФ α-типа [7]. В качестве стандарта использовали человеческий лейкоцитарный интерферон СОС 42-28-90-87 (ГИСК им. Л.А. Тарасевича, Москва).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исходя из предполагаемых свойств гибридного белка, которые, как мы полагали, будут главным образом определяться свойствами альбумина, мы разработали схему очистки Альбурона16 из культуральной среды ВММ, которая позволила нам получить препарат рекомбинантного химерного белка, свободного от основной массы примесных белков (рис. 1): ультрафильтрация → осаждение → гель-фильтрация на Sephacryl S-200 → хроматография на голубой сефарозе → гель-фильтрация на сефадексе G-25.

Несмотря на 90% очистку белка от примесей и хороший выход (~75%), удельная биологическая активность Альбурона16 сильно уменьшалась (табл. 1). Известно, что рекомбинантные ИФН-α и сшитые с альбумином белки образуют агрегаты, в основном, за счет гидрофобных взаимодействий. Для предотвращения агрегации химерного белка Альбутропина (альбумин-гормон роста человека) в процессе культивирования использова-

Таблица 1. Очистка Альбурона16 из культуральной среды ВММ

Стадии очистки	Объем, мл	Суммарный белок, мг	Биологическая активность, МЕ/мл	Удельная биологическая активность, МЕ/мг белка
Культуральная среда ВММ	1000	90.0	2000	22200
Ультрафильтрация и осаждение 75% сульфата аммония	20	33.0	317000	576000
Гель-фильтрация на Sephacryl S-200	80	9.8	15000	101000
Хроматография на Cibacron F3GA	10	3.5	7000	65000

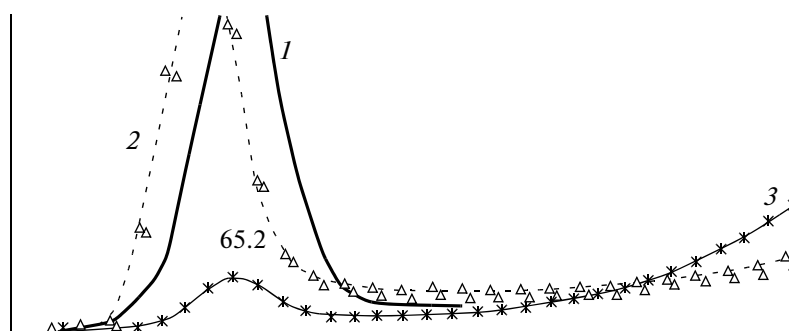


Рис. 2. Профиль элюции Альбурина16 при гель-фильтрации на BioRad P-300 с добавлением и без добавления детергентов.

1 – 20 mM натрий-ацетатный буфер, pH 5.5; 2 – твин-20 0.05%; 3 – ДДС 0.05%.

ли твин-20 и твин-80 [8–10]. Мы предположили, что агрегация может быть основной причиной снижения биологической активности химерного белка Альбурина16. Для проверки этого предположения провели фракционирование Альбурина16 на биогеле BioRad P-300 в присутствии различных детергентов. Фракционирование в присутствии ионного детергента (ДДС) приводило к уменьшению первого пика, соответствующего агрегированным молекулам белка, что свидетельствовало о разобщении белковых агрегатов. Добавление неионного детергента (твин-20) в стартовый буфер способствовало еще большей агрегации белка, о чем свидетельствовало уменьшение объема элюции Альбурина16 (рис. 2).

Разное поведение химерного белка было обусловлено свойствами использованных детергентов. Известно, что неионные детергенты, такие как тритон X-100 и твин-20, являются детергентами мягкого типа [11]. Напротив, ионные детергенты обладают сильной растворяющей способностью. В присутствии ДДС возрастала биологическая активность химерного белка. При этом активность была максимальной при pH 5.5 (табл. 2), что согласовалось с данными о влиянии состава буфера на стабильность и биологическую активность рекомбинантного ИФН- α 16 [12]. Полученные результаты подтвердили предположение о том, что агрегация химерного белка, обусловленная гидрофобными взаимодействиями, приводит к снижению биологической активности.

Возможно, использование высоких концентраций сульфата аммония для высаливания химерного белка Альбурина16 могло способствовать обнажению “отдаленных” гидрофобных участков белка, их взаимодействию друг с другом и агрегации, поэтому для предотвращения агрегации рекомбинантного химерного белка и сохранения его активности мы использовали другой метод осаждения. Известно, что ИФН- α / β хоро-

шо осаждаются ПЭГ 3350. Основным эффектом, приводящим к осаждению белков органическими растворителями (этиловый спирт, ацетон) и органическими полимерами (ПЭГ), является уменьшение способности воды к сольватации гидрофильных участков белка, в результате чего белки могут взаимодействовать друг с другом своими заряженными группами. Напротив, при осаждении белков нейтральными солями (сульфатом аммония) происходит сольватация ионов соли и освобождение гидрофобных участков белковой молекулы, которые взаимодействуют друг с другом [11]. Поскольку интерфероны хорошо осаждаются органическими полимерами, мы концентрировали Альбурина16 с помощью ПЭГ и обнаружили, что после осаждения ПЭГ химерный белок не агрегирует и легко солюбилизируется. При этом его биологическая активность оказалась в 2 раза выше, чем после осаждения сульфатом аммония (~200000 МЕ/мг белка при осаждении ПЭГ, 101000 МЕ/мг белка при осаждении сульфатом аммония).

Предложенная нами схема подходила для выделения и очистки химерного белка в лабораторных условиях и изучения его свойств, а также для анализа уровня синтеза Альбурина16, его биологической активности в зависимости от условий выращивания штамма *Pichia pastoris* GS115AbN16.

Таблица 2. Зависимость биологической активности химерного белка от pH и состава буфера

Буферные растворы	Биологическая активность, МЕ/мл	
	без ДДС	0.05% ДДС
50 mM трис-HCl, pH 7.5	8000	40000
PBS, pH 6.5	29000	200000
50 mM натрий-ацетат, pH 5.5	320000	400000

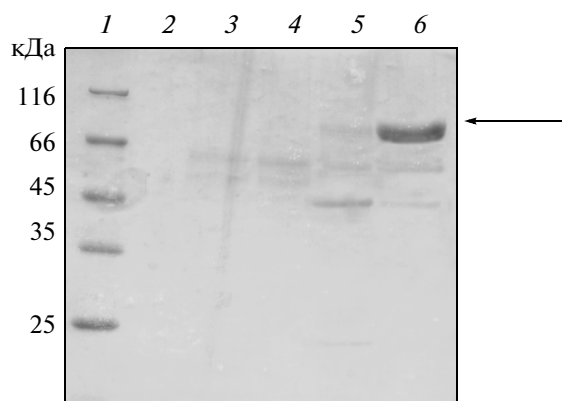


Рис. 3. Электрофореграмма фракций белков после разделения на фенил-сефарозе. 1 – маркеры молекулярной массы; 2 – белки, не сорбированные на колонке; 3 – элюция 1.0 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 4 – элюция 0.5 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 5 – элюция 50 мМ натрий-фосфатным буфером, рН 7,0; 6 – элюция 30%-ным изопропиловым спиртом. Стрелкой отмечен химерный белок Альбурон16.

На основе полученных данных мы разработали следующую схему очистки химерного белка из культуральной среды ВММ2, которая позволила нам получить очищенный на 85% препарат Альбурона16 с конечным выходом 80%.

Ультрафильтрация → обработка тетраборатом натрия → ИОХ на ДЭАЭЦ → осаждение ПЭГ → гель-фильтрация на Sephacryl S-200 → обращенно-фазовая хроматография на фенил-сефарозе.

На первой стадии очистки белок концентрировали из культуральной среды ВММ2 методом ультрафильтрации, используя мембрану AP-0.3-50ПС, которая позволяла отсекал вещества с молекулярной массой меньше 50 кДа. На этой стадии исходную культуральную жидкость концентрировали в 10 раз и удаляли низкомолекулярные примеси. Одним из способов “осветления” культуральной среды и ее очистки от углеводных компонентов (в том числе и гликопротеинов) является обработка раствора тетраборатом натрия. Тетраборат натрия (бура) используется как в биотехнологии в процессе очистки белков, так и в пищевой промышленности для концентрирования и кристаллизации различных углеводов [13–15].

Культуральную жидкость после концентрирования обрабатывали 0.05 М тетраборатом натрия в течение ночи, центрифугировали и наносили супернатант на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенную 50 мМ натрий-фосфатным буфером, рН 7.0. Колонку промывали 5 объемами 0.1 М NaCl и проводили элюцию белков линейным градиентом 0.1–1.0 М NaCl в стартовом буфере. Мы установили, что Альбурон16 элюировался с ДЭАЭЦ при промывании колонки 0.35 М NaCl, поэтому в дальнейших экспериментах ис-

пользовали ступенчатую элюцию химерного белка 0.35 М NaCl. Альбурон16, элюированный 0.35 М NaCl с ионообменника, осаждали 25% ПЭГ в течение ночи и наносили на колонку с Sephacryl S-200.

Гель-фильтрация на Sephacryl S-200 позволила нам избавиться от значительного количества примесных белков, в основном являющихся продуктами протеолиза Альбурона16 [3].

Известно, что рекомбинантный альбумин человека эффективно очищают на колонках с фенил-сефарозой [15]. Фенил-сефароза CL-4В обладает высокой емкостью, а метод обращенно-фазовой хроматографии отличается простотой в использовании, экономичностью и легко поддается масштабированию. В предварительных экспериментах мы подобрали условия сорбции–десорбции Альбурона16 на фенил-сефарозе, и установили, что сульфат аммония не способствует агрегации химерного белка при концентрации менее 50% насыщения.

Фракции белков после гель-фильтрации на Sephacryl S-200, в которых по результатам электрофореза содержался Альбурон16, объединяли, добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 1.5 М (~35% насыщения), сорбировали на колонке с фенил-сефарозой, промывали и проводили ступенчатую элюцию белков. Результаты эксперимента представлены на рис. 3.

Как видно из рис. 3, Альбурон16 элюируется с колонки изопропанолом. Анализ электрофореграмм и денситограмм полученного препарата показал, что содержание примесей (продуктов протеолиза) не превышал 15%. Раствор с Альбурон16 после элюции с фенил-сефарозы диализовали против 20 мМ натрий-ацетатного буфера, рН 5.5 и определяли биологическую активность.

В приведенной выше схеме очистки Альбурона16 мы использовали широко распространенные методы выделения белков (в том числе альбуминов и интерферонов) с помощью ионообменной и обращенно-фазовой хроматографии, очистку культуральной жидкости от углеводных компонентов и гликопротеинов с помощью буры, а также более мягкие условия концентрирования и осаждения белков с помощью ПЭГ. Применение этих методов способствовало увеличению удельной биологической активности Альбурона16 в процессе очистки (табл. 3). Следует отметить, что в данном случае в ходе выращивания клеток и очистки химерного белка не используются пептон и KSCN, которые могут служить препятствием для дальнейшего внедрения разработанной нами схемы. При переходе на крупномасштабное производство данная схема может быть легко модифицирована с помощью широко распространенного в последнее время метода адсорбционной хроматографии в расширенном слое (АРС).

Таблица 3. Очистка Альбуруна16 из культуральной среды ВММ2

Стадии очистки	Объем, мл	Суммарный белок, мг	Альбурун16, мг	Биологическая активность, МЕ/мл	Удельная биологическая активность, МЕ/мг
Культуральная среда ВММ2	1000	40.0	3.2	640	16000
Ультрафильтрация и хроматография на ДЭАЭЦ	20	9.0	3.0	52000	116000
Осаждение ПЭГ и гель-фильтрация на Sephacryl S-200	30	6.6	2.7	35000	165000
Хроматография на фенол-сефарозе	4	3.0	2.6	286000	375000

Использование метода APC позволяет объединить этапы осветления, концентрирования и первоначальной очистки в один операционный блок. Благодаря этому повышается экономичность процесса, сокращается количества этапов, увеличивается выход продукта и уменьшается время процесса. “Pharmacia Biotech AB” (Швеция) производят новые типы хроматографических адсорбентов и колонок для APC под названием STREAMLINE™, которые позволяют формировать устойчивые расширенные слои при высоких скоростях потока буфера [16, 17].

Метод APC (STREAMLINE™) является универсальным инструментом, который применим для начальной очистки целевого продукта из всех обычно используемых сырьевых источников: гомогенатов, лизатов, культуральных сред, молока, экстрактов и т.д. [18]. Например, при выделении рекомбинантного альбумина человека из культуральной среды дрожжей *P. pastoris* на колонках STREAMLINE™ удалось увеличить выход белка на 45% и ускорить стадию очистки [19]. APC при помощи адсорбентов и колонок STREAMLINE™ — легко масштабируемый метод, который используется в производственных цехах фармацевтических заводов.

Приведенный выше метод концентрирования и очистки Альбуруна16 из культуральной среды ВММ2 дрожжей *P. pastoris*, может быть легко масштабирован и усовершенствован с помощью колонок STREAMLINE™ DEAE, что упростит процесс очистки и будет способствовать скорейшему внедрению в производство технологии получения нового лекарственного препарата на основе рекомбинантного химерного белка Альбуруна16.

Данная работа выполнена в рамках проведения фундаментальных исследований по приоритетным направлениям программы развития СПбГУ (1.37.115.2011), тематического плана фундаментальных НИР (1.0.131.2010), ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы” (ГК № 16.512.11.2038 “2011-1.2-512-049-044”) и ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной Рос-

сии” на 2009–2013 годы (Мероприятия 1.1, 1.5, 2.1, ГК № 02.740.11.0768, “2010-1.1-202-059”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Muller D., Bayer K., Mattanovich D. // Microbial Cell Factories. 2006. V. 5. P. 61.
2. Steinberg F.M., Raso J. // J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 1998. V. 1. P. 48–59.
3. Карабельский А.В., Зиновьева Ю.Г., Смирнов М.Н., Падкина М.В. // Вестник СПбГУ. 2009. сер. 3. № 2. С. 52–62.
4. Патент РФ. 2009. № 2373286.
5. Bradford M.A. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
6. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
7. Liu P.T., Ta T.V., Villarete L.H. // Protein Expr. Purif. 2001. V. 22. P. 381–387.
8. Ruiz L., Reyes N., Duany L., Franco A., Aroche K., Hardy Rando E. // Int. J. Pharm. 2003. V. 264. P. 57–72.
9. Chou D.K., Krishnamurthy R., Randolph T.W., Carpenter J.F., Manning M.C. // J. Pharm. Sci. 2005. V. 94. P. 1368–1381.
10. Hawe A., Friess W. // J. Pharm. Sci. 2007. V. 96. P. 2987–2999.
11. Скоупс Р. Методы очистки белков. М.: Мир, 1985. 360 с.
12. Патент РФ. 2007. № 2380405.
13. Honda S. // J. Chromatogr. A. 1996. V. 720. P. 337–351.
14. Храпцов А.Г., Евдокимов И.А., Рябцева С.А., Серов А.В., Лодыгин Д.Н., Полищук Д.О., Харитонов Д.В., Самойлов В.А., Нестеренко П.Г., Журба Л.Н. // Вестник СевКавГТУ. Сер. “Продовольствие”. 2003. № 1. http://www.ncstu.info/content/_docs/pdf/_trudi/_food/6/21.pdf
15. Bobik T.V., Vorob'ev I.I., Ponomarenko N.A., Gabibov A.G., Miroshnikov A.I. // Bioorg. Khim. 2008. V. 34 P. 56–62.
16. McCormick D.K. // Biotechnology (N Y). 1993. V. 11. P. 1059.
17. Hjorth R., Kämpe S., Carlsson M. // Bioseparation. 1995. V. 5. P. 217–223.
18. Волков Г.Л., Андрианов С.И., Горошникова Т. В., Гаврилюк Е.С. // Укр. биохим. журн. 2002. Т. 74. № 6. С. 5–16.
19. Sumi A., Okuyama K., Kobayashi K., Ohtani W., Ohmura T., Yokoyama K. // Bioseparation. 1999. V. 8. P. 195–200.

Purification of the Chimeric Protein Alburon16 from a Culture Medium of the Yeast *Pichia pastoris*

A. V. Karabel'skii and M. V. Padkina

St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

e-mail: karabelsky@gmail.com

Received October 10, 2011

Abstract—Conditions have been created for the isolation of the chimeric protein Alburon16 (human albumin-interferon- α 16) from a culture medium of the yeast *Pichia pastoris*, under which there is no aggregation of the protein and its biological activity is maintained. The proposed scheme can be used for the isolation and purification of a chimeric protein in laboratory conditions. The obtained results may be useful for improving the purification methods of various recombinant proteins synthesized and secreted by the yeast *P. pastoris*.