

Пилотный способ получения рекомбинантной легкой цепи энтеропептидазы человека технической чистоты, содержащей каскад из двух аффинных меток

Научный руководитель – Макаров Дмитрий Александрович

Калинин Данил Сергеевич

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биотехнологический факультет, Москва, Россия

E-mail: 309163@gmail.com

Упрощение очистки и идентификации интересующего белка зачастую основывается на создании гибридных конструкций, включающих дополнительные аминокислотные последовательности - аффинных метки (affinitytag). Кроме того, использование аффинных меток в составе гибридной конструкции может увеличить экспрессию, улучшить растворимость и обеспечить правильный фолдинг. Однако присутствие дополнительных аминокислотных остатков зачастую негативно влияет на биологическую активность целевого продукта. Отделение аффинной метки может быть достигнуто ферментативным гидролизом. Одним из наиболее широко используемых протеолитических ферментов является энтеропептидаза человека (ЕК).

Целью настоящей работы была разработка пилотного способа получения рекомбинантной легкой цепи энтеропептидазы человека технической чистоты, содержащей каскад из двух аффинных меток (t-L-NEP) и её иммобилизованного варианта (i-L-NEP). Для этого был создан экспрессионный плазмидный вектор pL-NEP-His6-CBD, кодирующий гибридный белок, содержащий металл связывающий (His-6) и хитин связывающий (CBD) домены, и штамм-продуцент на основе *Escherichia coli* BL21(DE3). Нами была разработана простая схема очистки гибридного (ГБ) с применением металл-хелатной хроматографии на фоне высокой концентрации хаотропного агента, а также оптимизированы условия ренатурации ГБ. Полученный ферментативный препарат чистотой не менее 80% проявлял активность соизмеримую с ферментативным препаратом, не содержащим аффинных меток. На следующем этапе работы была осуществлена иммобилизация препарата t-L-NEP, поскольку это является оптимальным технологическим решением, обеспечивающим снижение материальных издержек при производстве терапевтических белков на стадии отделения аффинной метки от целевого продукта. Иммобилизацию t-L-NEP осуществляли на хитиновой смоле. Активность i-L-NEP подтверждали расщеплением модельного гибридного белка batchметодом, то есть путём его добавления непосредственно в реакционную смесь. Было показано незначительное снижение ферментативной активности иммобилизованной формы i-L-NEP по сравнению с растворимой t-L-NEP, при этом стабильность ферментативного препарата сохранялась на протяжении не менее девяти циклов.

В результате был разработан эффективный способ получения рекомбинантной легкой цепи энтеропептидазы человека, содержащей каскад из двух аффинных меток и её иммобилизованного варианта и показана возможность применения последнего в производстве.