



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **44814** (13) **U**  
(51) МПК (2009)  
C12N 15/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ СУПЕРСИНТЕЗУ РЕКОМБІНАНТНОГО БІЛКА rExhCD34 ПРОДУЦЕНТОМ ШТАМУ E.COLI BL21hCD34**

1

2

(21) u200905800

(22) 05.06.2009

(24) 12.10.2009

(46) 12.10.2009, Бюл.№ 19, 2009 р.

(72) КОРДЮМ ВІТАЛІЙ АРНОЛЬДОВИЧ, ГІЛЬЧУК  
ПАВЛО ВОЛОДИМИРОВИЧ, ІРОДОВ ДМИТРО  
МИХАЙЛОВИЧ, ФЛЯК АНДРІЙ ІГОРОВИЧ, ГОР-

БАТЮК ОКСАНА БОРИСІВНА, НІКОЛАЄВ ЮЛІАН  
СЕРГІЙОВИЧ, ГІЛЬЧУК ЮЛІЯ МИКОЛАЇВНА

(73) КОРДЮМ ВІТАЛІЙ АРНОЛЬДОВИЧ

(57) Спосіб суперсинтезу рекомбінантного білка  
rExhCD34 продуцентом штаму E.coli BL21hCD34,  
який включає культивування продуценту на сере-  
довищі, що містить лактозу і глюкозу.

Пропонована корисна модель відноситься до розділу молекулярної біології, генної інженерії, а саме - до способу суперсинтезу рекомбінантного білка REhCD34 продуцентом штаму E. coli BL21hCD34, який може бути використаний в біотехнології для одержання діагностичних поліклональних антитіл проти поверхневих маркерів клітин і науково-дослідницької роботи.

Аналогами рекомбінантного білка rExhCD34 є поверхневий антиген CD34 людини, що синтезується різними типами клітин людини, а також лініями мієлобластодних клітин людини KG1 та KG1a у двох формах (385 та 328 амінокислотних залишків (а.з.)), і CD34, одержаний на основі Г.І. технології шляхом експресії клонованого гена в культурі клітин ссавців (Simmons, D.L., Satterthwaite, A.B., Tenen, D.G. and Seed B., Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. J Immunol, 1992. 148(1): p.267-71.; Mickey C.-T. Ni and Shu L. Chien, The Cytoplasmic Domain of Stem Cell Antigen CD34 Is Essential for Cytoadhesion Signaling But Not Sufficient for Proliferation Signaling. Blood, 1998. 91: 1152-1162.) Рекомбінантних аналогів антигену CD34 людини, які одержують синтезом в бактеріях E. coli, на сьогодні не створено.

CD34 є поверхневим високоглікозильованим білком, який синтезується стромальними клітинами кісткового мозку, клітинами-попередниками гематопоезу, ендотеліальними клітинами, ембріональними фібробластами, нейронами. При патологічних станах CD34 синтезують різні типи гематопоетичних пухлин, а також деякі солідні пухлини (Lanza, F., L. Healy, and D.R. Sutherland, Structural and functional features of the CD34 antigen: an

update. J Biol Regul Homeost Agents, 2001. 15(1): p.1-13.). Продуктом експресії гена CD34 є білок з молекулярною масою 40кДа і електрофоретичною рухливістю близько 110кДа, що зумовлено наявністю численних вуглеводних залишків в його складі. Антиген локалізується в плазматичній мембрані і містить три домени - високоглікозильований зовнішньоклітинний (258а.м.к.), трансмембранний (23а.м.к.) і цитоплазматичний (73а.м.к.), що містить залишки серину для фосфорилування. CD34 має велике діагностичне значення, а також є ключовим маркером за яким фракціонують клітини-попередники гематопоезу (гематопоетичні стовбурові клітини) для подальшої їх трансплантації реципієнту після опромінення (Gangenahalli GU, Singh VK, Verma YK, Gupta P, Sharma RK, Chandra R, Luthra PM, Hematopoietic stem cell antigen CD34: role in adhesion or homing. Stem Cells Dev, 2006 Jun;15(3): p.305-13.). Вищезазначені маніпуляції можливі завдяки специфічним моноклональним антитілам, які одержують шляхом імунізації мишей екстрактами клітин, що містять CD34 антиген, і наступним злиттям плазматичних клітин імунізованих тварин з лінією мієлобластодних клітин для створення продуцентів моноклональних антитіл - гібридом (Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // Nature. - 1975. - Vol.256, №5517. - P.495-497). Одержання і відбір гібридом, що синтезують моноклональні антитіла необхідної специфічності, є довготривалим процесом, а продукування та очищення моноклональних антитіл потребує високих затрат на середовища та реактиви. Альтернативним способом є одержання специфічних поліклональних антитіл шляхом імуніза-

(13) **U**  
(11) **44814**  
(19) **UA**

ції тварин, який, у свою чергу, є значно дешевшим, однак потребує наявності великої кількості високо очищеного білка CD34, що є неможливим у разі використання екстрактів CD34+ клітин як єдиного джерела даного антигену. Відомий CD34-антиген людини Г.І. походження, продукований трансфікованою лінією клітин ссавців COS під контролем промотору плазмиди CDM8. Плазміда для синтезу рекомбінантного CD34 містить в собі кДНК послідовність гена CD34 із лінії клітин KG1 розміром 2615.П.Н. Білок CD34 синтезується культурою клітин еукаріотів на поверхні плазматичної мембрани у вигляді продукту 110кДа (Simmons, D.L., Satterthwaite, A.B., Tenen, D.G. and Seed B., Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. J Immunol, 1992. 148(1): p.267-71.). Зазначений спосіб одержання антигену CD34 має суттєві недоліки, серед яких можна вказати низький рівень його синтезу клітинами еукаріотів, довготривалість культивування та нестабільність трансфікованої клітинної лінії, високу вартість поживних середовищ, неможливість одержання препаративної кількості антигену в умовах лабораторії і складність процедури його очищення. Також гетерогенний характер приєднання глікозильних залишків до поліпептидного ланцюгу CD34 у разі його синтезу трансфікованою лінією еукаріотичних клітин змінює антигенні властивості CD34, що, в свою чергу, ускладнює його використання у процедурах одержання універсальних специфічних полі- і моноклональних антитіл проти білкових детермінант.

У той же час генно-інженерні технології дозволяють клонувати гени еукаріотів і забезпечувати їх високоефективну експресію в бактеріях *E. coli* (Т. Маніатіс "Молекулярне клонування-Лабораторна збірка методик"9, Колд Спрінг Харбор Лабораторі, Колд Спрінг Харбор, том 1-3. 1989р.). Потім білок може бути виділений з бактеріальних клітин і очищений за відомими методиками. У таких спосіб рекомбінантний антиген CD34 може бути одержано у кількостях, необхідних для імунізації тварин, продукування специфічних поліклональних антитіл та їхнього очищення. У той же час технологія одержання рекомбінантного антигену CD34 людини потребує розробки ефективного та дешевого способу суперпродукції рекомбінантного антигену в бактеріях.

В основу пропонованої корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб суперсинтезу рекомбінантного білка REhCD34 продуцентом штаму *E. coli*, який би забезпечив оптимальний спосіб продукування рекомбінантного білка гExhCD34 та був би більш дешевшим і технологічним.

Поставлена задача вирішується пропонованим способом суперсинтезу рекомбінантного білка гExhCD34 продуцентом штаму *E. coli* BL21hCD34, який включає культивування продуценту на середовищі, що містить лактозу і глюкозу.

Продукування рекомбінантного білка гExhCD34 в бактеріальних клітинах може бути здійснено з використанням методик, відомих спеціалістам даної галузі. Однак, як вказано, дана корисна модель забезпечує оптимальний спосіб продукування рекомбінантного білка гExhCD34, за

допомогою якого досягається максимальне накопичення цільового білка штамом продуцентом у лабораторних умовах, а також використовується лактоза, яка є значно дешевшою ніж загальноживильний індуктор експресії ізопропіл-бета-D-галактопіранозид (ІПТГ). Відповідно до пропозиції спосіб суперсинтезу модифікованого генно-інженерного рекомбінантного білка гExhCD34 штамом продуценту *E. coli* BL21hCD34 полягає у інокуляції аліквоти бактеріальної культури із вихідного її стоку безпосередньо у поживне рідке середовище, що містить лактозу і глюкозу у кінцевих концентраціях, 0.2% і 0.05% відповідно. Культивування проводили при 30 або 37°C і інтенсивній аерації протягом 20-24 год., кінцева оптична щільність культури продуценту індукованої у такий спосіб складала OD600=12-15. Вихід рекомбінантного білка гExhCD34, який становить до 500мг на 1л клітинної суспензії, визначали електрофоретичним розділенням сумарних білків продуценту в 12%-му поліакриламідному гелі з наступним денситометруванням електрофореграм і порівнянням цільового білка із білком відомої концентрації відповідно до стандартної методики денситометрії білків, відомої спеціалістам даної галузі. Синтезований білок гExhCD34 виявлявся в клітинних лізатах продуценту і у фракції нерозчинних білків після індукування експресії за вищенаведеним способом у вигляді домінуючої полоси розміром близько 30кДа (Фіг.1).

Суть корисної моделі пояснюється Фіг.1 - електрофоретичний аналіз експресії білка гExhCD34 штамом продуцентом BL21HCD34, де 1 - сумарний лізат клітин продуценту після культивування протягом 20 год. у присутності індуктора експресії; 2 - фракція нерозчинних білків клітин (тілець включення); 3 - фракція розчинних білків клітин; 4 - маркер молекулярної маси білків.

Приклад

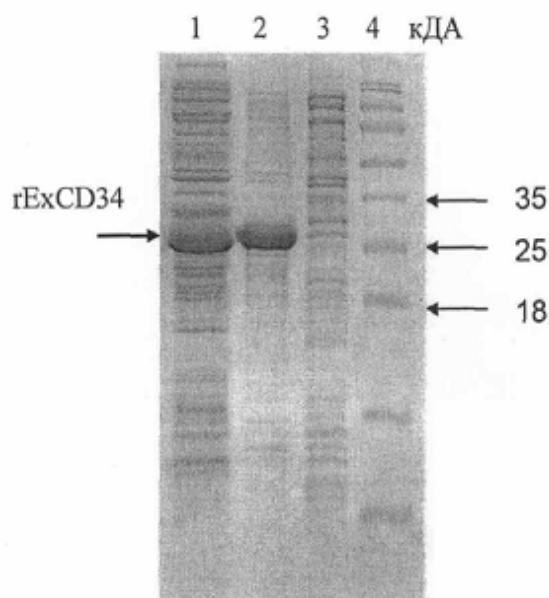
Суперсинтез рекомбінантного білка гExhCD34 в бактеріях *E. coli*.

Для одержання гExhCD34 використовували штам *E. coli* BL21(DE3), трансформований плазмідною pREhCD34, яка має маркер селекції канаміцин-резистентності. Плазміда забезпечує індукований аналогами лактози синтез цільового білка, який нагромаджується в цитоплазмі клітин бактерій в ранній стаціонарній фазі росту культури у вигляді тілець включення. Культивування бактерій проводили у 4л колбах при 37°C на середовищі 2хYT (17г/л бактотриптон; 10г/л дріжджового екстракту; 5г/л NaCl) з 50мкг/мл канаміцину, 25мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1мМ MgSO<sub>4</sub>, 0.05% глюкозою, 0.2% α-лактозою, 0.5% гліцеролом, протягом 16-24 годин на шейкері-інкубаторі за інтенсивної аерації (150-200 об/хв.). Після закінчення культивування клітини осаджували центрифугуванням при 3000g 10 хвилин при 4°C, надосадову рідину видаляли, а осад суспендували в 10мМ буфері Трис-HCl, pH 8 (10мл буферу на 1г клітинного осаду), який містив 1мг/мл лізоциму і 50мкг/мл ДНК-ази і інкубували 20 хвилин за кімнатної температури. Суспензію клітин обробляли ультразвуком на ультразвуковому дезінтеграторі і центрифугували 15 хвилин при

10000g. Супернатант видаляли, а осад суспендували в 10мМ буфері Трис-НСІ, рН8, який містив в собі 0,5% дезоксихолату натрію. Промивання здійснювали шляхом повного суспендування нерозчинного білка на ультразвуковому дезінтеграторі з наступним відділенням осаду центрифугуванням. Одержані тільця включення, які містили рекомбінантний білок rExhCD34, зберігали при - 70°C. Одержання різних фракцій білків Е. соїї, приготування проб для електрофоретичного розділення в поліакриламідному гелі проводили за стандартними методами (Sambrook, Joseph Molecular cloning: a laboratory manual/ E.F. Fitch, T. Maniatis -2-nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989 V.3 p. 18.49-18.57). Для приготування проб білків використовували розведений у 6 разів концентрат буфер складу: 0,3 М трис-НСІ; 25% гліцерин; 3,5% додецилсульфат натрію; 0,6М 2-меркаптоетанол, 0,5% бромфеноловий синій рН

(6,8). Електрофорез білків проводили за методом U. Laemmli (Westermeier R. Electrophoresis т practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations. - Weinheim: VCH, 1997. - P. 331), використовуючи для їхнього розділення 12-15%-й поліакриламідний гель з 0,1% додецилсульфату натрію. Кількість сумарного білка у різних фракціях клітин визначали методом М. Bradford (Дарбре А. Практическая химия белка: Пер. с англ. - М.: Мир, 1989. - 623с, с.297 - 298).

Рівень експресії rExhCD34 штамом продуцентом визначали за допомогою сканування і денситометрії електрофореграм використовуючи як стандарт БСА з відомою концентрацією для одержання калібрувальної кривої. Представлена на Фіг.1. електрофореграма показує суперсинтез рекомбінантного білка rExhCD34 бактеріальним штамом-продуцентом і його накопичення у нерозчинній фракції білків клітин - тільцях включення.



Фіг. 1