

**ОПТИМИЗАЦИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ
РЕКОМБИНАНТНОГО ФЬЮЖН–БЕЛКА
SUMO–ESC–B(1–20)**

*Сауткина Наталья Владимировна¹, ассистент,
Бусленко Анна Владимировна², инженер лаборатории,
Прокулевич Владимир Антонович¹, д.б.н., профессор,
заведующий кафедрой микробиологии*

*¹Белорусский государственный университет
²РУП "Институт мясо–молочной промышленности"*

Введение. Катионные пептиды земноводных обладают высокой антибактериальной активностью в отношении широкого спектра бактерий и поэтому являются перспективными компонентами новых лекарственных средств для борьбы с антибиотикорезистентными штаммами патогенных бактерий [1].

Катионный пептид эскулентин–b(1–20) (Esc–b(1–20)), сохраняет свойства антимикробного пептида эскулентина–1b лягушки (*Rana esculenta* L., 1758), являясь его N–концевым производным [2]. Пептид Esc–b(1–20) ранее получен в клетках штамма *Escherichia coli* BL21–CodonPlus(DE3)–R1PL в составе рекомбинантного фьюжн–белка SUMO–Esc–b(1–20), в котором фьюжн–партнером пептида выступает анионный белок – малый убиквитин–подобный модификатор дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (SUMO) [3]. Присоединение белка SUMO, снабженного гистидиновой меткой, к пептиду Esc–b(1–20) способствует повышению уровня экспрессии всего фьюжн–белка, его растворимости, а также проведению металл–хелатной хроматографии. Целью данной работы является оптимизация процесса хроматографической очистки рекомбинантного фьюжн–белка SUMO–Esc–b(1–20).

Материалы и методы. Клетки штамма–продуцента белка SUMO–Esc–b(1–20) разрушали гомогенизатором высокого давления Panda Plus 2000 (GEA Niro Soavi) и с помощью ультразвукового гомогенизатора Bandelin 3100 (Bandelin Electronic GmbH) согласно инструкциям производителей. В таблице представлены буферы, использованные для разрушения клеток.

Таблица – Буферные растворы для разрушения клеток

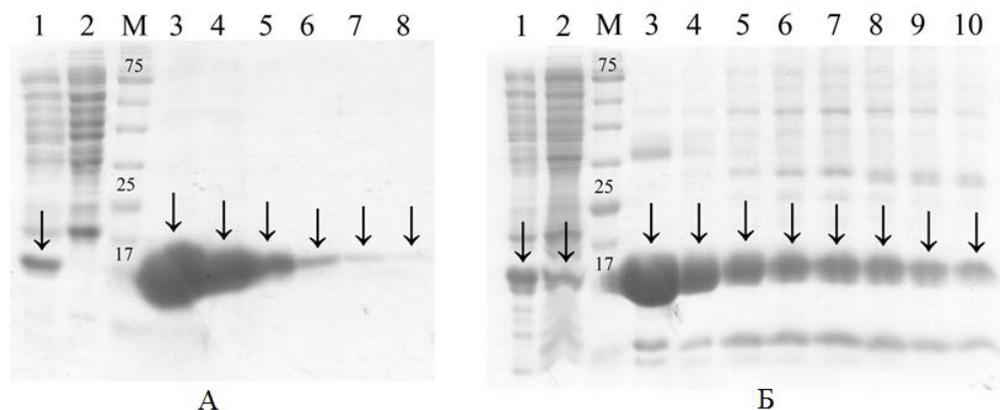
Буфер	Состав буфера	Значение pH буфера
1	50 ммоль/л трис–HCl; 2,5 ммоль/л MgCl ₂	pH 8,5
2	50 ммоль/л трис–HCl; 2,5 ммоль/л MgCl ₂ ; 0,5 моль NaCl	pH 8,5
3	50 ммоль/л NaH ₂ PO ₄ ; 2,5 ммоль/л MgCl ₂	pH 5,6
4	50 ммоль/л NaH ₂ PO ₄ ; 2,5 ммоль/л MgCl ₂ ; 0,5 моль/л NaCl	pH 5,6

Хроматографическую очистку фьюжн–белка проводили на сорбенте HisPur™ Ni–NTA Superflow Agarose (Thermo Scientific) согласно рекомендациям производителя сорбента. Для определения заряда и изоэлектрической точки фьюжн–белка использовали приложение EditSeq пакета программ Lasergene (DNASTAR). Цифровые изображения окрашенных полиакриламидных гелей (ПААГ) анализировали при помощи программы ImageJ (National Institutes of Health).

Результаты исследования. Поскольку фьюжн–белок SUMO–Esc–b(1–20) при 37 °C в клетках *E. coli* накапливается в равной степени как в растворимой, так и нерастворимой форме [3], после наработки белка бактериальные клетки разрушали френч–прессом в стандартном буфере для разрушения клеток (50 ммоль/л трис–HCl; 10 ммоль/л MgCl₂; 5 ммоль/л CaCl₂; 0,5 моль/л NaCl; pH 8,0) и проводили металл–хелатную хроматографию супернатанта клеточного гомогената.

Во время проведения хроматографической очистки выяснилось, что клеточный белок выпадает в осадок на колонке, а также то, что в профильтрованном супернатанте клеточного гомогената также образуется осадок клеточных белков, по–видимому, вследствие непригодности стандартного буфера для разрушения клеток из–за его состава, в частности большой концентрации магния хлорида и наличия кальция хлорида. Поэтому на следующем этапе работы подбирали подходящий буфер для разрушения клеток, в котором белок не будет выпадать в осадок и очистится в полном объеме. Для этого 1 г клеток бактерий разрушали с помощью ультразвука в 10 мл буферов, отличающихся по составу и pH (буферы 1, 2, 3, 4 и уравнивающий буфер для металл–хелатной хроматографии, который использовали при первой очистке). Профильтрованные супернатанты гомогенатов оставляли на сутки при температуре +4 °C, затем визуально анализировали растворы. В результате установили, что наименьшее количество осадка образуется в гомогенатах на основе буферов с pH, отличным на 1,5 значения в большую или меньшую сторону от изоэлектрической точки фьюжн–белка SUMO–Esc–b(1–20) равной 7,1, а именно буферов 2 (pH 8,5) и 4 (pH 5,6). Эти буферы включают в свой состав магния хлорид и натрия хлорид, но отличаются соединением, обеспечивающим буферность: в буфере 2 это трис–HCl, а в буфере 4 – натрия дигидрофосфат.

Поэтому далее клетки разрушали в буферах 2 и 4 френч–прессом, а осветлённые центрифугированием гомогенаты подвергали афинной металл–хелатной хроматографии (рисунок).



А – очистка белка после разрушения клеток в буфере 2; Б – очистка белка после разрушения клеток в буфере 4; 1 – профильтрованный супернатант клеточного гомогената, содержащий белок SUMO–Esc–b(1–20); 2 – фракция белков, не связавшихся с сорбентом;

3–10 – фракции элюции белка SUMO–Esc–b(1–20); М – маркер молекулярного веса Protein Marker VI (10–245) prestained (PanReac AppliChem). Стрелками указан очищенный фьюжн–белок, цифры на маркере молекулярного веса обозначают массу в кДа.

Рисунок – Электрофореграмма результатов хроматографической очистки белка SUMO–Esc–b(1–20) после разрушения клеток–продуцентов в буферах 2 и 4

При нанесении образцов в буфере 4 наблюдалось лучшее связывание целевого продукта с сорбентом: содержание SUMO–Esc–b(1–20) в проскоке всего 0,5 %, по сравнению с 10 % для буфера 2 (рисунок 1А, 1Б, дорожки 2); и более острый пик элюции: более 95 % белка элюировалось менее чем тремя объёмами колонки (рисунок 1Б, дорожки 3–8).

Таким образом, для разрушения клеток–продуцентов с последующей хроматографической очисткой фьюжн–белка SUMO–Esc–b(1–20) подходят буферы 2 (50 ммоль/л трис–HCl; 2,5 ммоль/л MgCl₂; 0,5 моль NaCl; pH 8,5) и 4 (50 ммоль/л NaH₂PO₄; 2,5 ммоль/л MgCl₂; 0,5 моль/л NaCl; pH 5,6), поскольку в них белки супернатанта клеточного гомогената не выпадают в осадок, однако после разрушения клеток в буфере 4 хроматографическая очистка белка проходит эффективнее.

Список использованных источников

1. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane–bound concentrations / M.N. Melo [et al.] // Nature reviews Microbiology. – 2009. – Vol. 7, No 3. – P. 245–250.
2. Esculentin–1b(1–18) – a membrane–active antimicrobial peptide that synergizes with antibiotics and modifies the expression level of a limited number of proteins in *Escherichia coli* / L. Marcellinii [et al.] // The FEBS Journal. – 2009. – Vol. 276, No 19. – P. 5647–5664.

3. Получение рекомбинантного фьюжн-белка SUMO-Esc-b(1-20), включающего N-концевой фрагмент антимикробного пептида эскулентина-1b / А.В. Бусленко [и др.] // Биология – наука XXI века: сборник тезисов 22-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых, Пущино, 23–27 апреля 2018 г. / Пущинский науч. центр РАН, Пущинский гос. ун-т; редкол.: А.И. Мирошников [и др.]. – Пущино, 2018. – С. 67–68.