УДК 606:61(043.2)

**Святенко О.В.1 , Горбатюк О.Б.2, Васильченко О.А.1**

*1Національний Авіаційний Університет, Київ*

*2ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ*

**ОДЕРЖАННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО ЗЛИТОГО БІЛКА SPA – CBD2**

**В E.СOLI**

Очищені антитіла широко використовуються як для фундаментальних, так і на прикладних досліджень. Тому актуальним є створення нових афінних сорбентів для їх одержання із складних сумішей. Зазвичай, використовують сорбенти на основі білків з імуноглобулінзв’язувальними властивостями. Одним із них є поверхневий білок А *Staphylococcus aureus* (SPA). SPA складається з п’яти високогомологічних імуноглобулінзв’язувальних доменів, кожен з яких здатний специфічно взаємодіяти з константними (Fc) доменами антитіл різних видів тварин та людини. Сайт зв’язування SPA локалізований на ділянці важкого ланцюга, яка включає домени CH2 та CH3 більшості класів IgG. Завдяки здатності взаємодіяти з антитілами в такий спосіб, що їх антиген зв’язувальний сайт залишається вільним, SPA широко використовується для хроматографічного очищення антитіл та діагностики [1]. SPA притаманна висока конформаційна стабільність, стійкість до фізико-хімічних чинників та протеаз. Білок А стабільний в широкому діапазоні pH (2.0 – 11.0) та може бути ренатурований після його обробки денатуруючим розчином сечовини. Відсутність цистеїнових залишків спрощує процедуру очищення білка А [2].Саметому білок А є ефективним лігандом для афінної хроматографії. Зазвичай, іммобілізацію білкових лігандів проводять на хімічно активованих матрицях, що призводить до втрати функціональної активності ліганду. Альтернативою є використання целюлозо-зв’язувального домену (СВD).

СВD – некаталітична субодиниця ферментів, які розщеплюють целюлозу, або ферментних комплексів, що містяться в багатьох бактеріях і грибах, субстратом для яких є целюлоза. СВD може бути виділений з целюлози в м’яких умовах і цей процес не потребує специфічних реагентів. СВD зберігає свої целюлозозв’язувальні властивості при сполученні з гетерологічними білками та може бути використаний як афінний тег для очищення та іммобілізації білків. Виявлено, що целюлозозв’язувальні домени сполучені з одноланцюговими антитілами можуть приєднуватися зворотньо до целюлози в присутності 6М сечовини [3].

Генно-інженерне злиття ДНК послідовності білка А з ДНК послідовностю CBD, виділеного з целюлозолітичного комплексу *Clostridium thermocellum*, забезпечує біоафінне зв’язування на целюлозі або хітині. Головною перевагою є здатність CBD до специфічної взаємодії з вуглеводневим остовом целюлози в нативних та денатурувальних умовах, що забезпечує орієнтовану іммобілізацію білкової молекули на матриці та експонування активних центрів зв’язування в положення, оптимальне для взаємодії з лігандом.

**Метою роботи** було одержання рекомбінантного злитого білка SPA-CBD2 бактеріальним синтезом та встановлення його характеристик.

**Методи:** культивування бактерій, експресія білків, виділення білків, електрофорез білків.

**Результати.** В результаті проведеної роботи були встановлені умови ферментації, які забезпечили суперпродукцію рекомбінантного злитого білка SPA-CBD2 в клітинах продуцента штаму *E. coli* BL21 (DE3). Рекомбінантний злитий білок SPA-CBD2 експресувався в розчинній фракції цитоплазматичних білків клітини. Функціональна активність обох білків партнерів рекомбінантного злитого білка SPA-CBD2 була підтверджена в результаті взаємодії відповідно SPA з антитілами, СBD – з целюлозою.

*Список літератури:*

1. Graille M., Stura E. A., Corper A. L., Sutton B. J., Taussig M. J., Charbonnier J.-B., Silverman G. J. 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 // PNAS. – 2000. – p. 5399 – 5404.
2. Gottschalk U. Process scale purification of antibodies. – Hoboken: Wiley & Sons, 2009. – 430 p.
3. Morag E., Lapidot A., Gorovko D., Lamed R., Wilchek M., Bayer E. A., Shoham Y. Expression, purification and characterization of the cellulose-binding domain of the scaffoldin subunit from the cellulosome of *Clostridium thermocellum* // Applied and Environmental Microbiology. – 1995. - №5. – p. 1980 – 1986.