

## ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ПРОКАЛЬЦИТОНИНА ЧЕЛОВЕКА И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО ИММУНОГЕННЫХ СВОЙСТВ

Квач С.В.<sup>1</sup>, Рышко А.Н.<sup>1</sup>, Радевич Д.С.<sup>1</sup>, Зинченко А.И.<sup>1</sup>, Акалович С.Т.<sup>2</sup>, Дорошенко Т.М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии НАН Беларуси, 220141, Минск, ул. Купревича, 2;  
e-mail: [zinch@mbio.bas-net.by](mailto:zinch@mbio.bas-net.by)

<sup>2</sup>РНИЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, 220053, Долгиновский тракт, 160; e-mail: [dor\\_t\\_m@mail.ru](mailto:dor_t_m@mail.ru)

Прокальцитонин (ПКТ) – это предшественник гормона кальцитонина, состоящий из 116 аминокислот. При наличии инфекции и/или развитии сепсиса провоспалительные цитокины и бактериальные липополисахариды индуцируют образование прокальцитонина не только в специализированных С-клетках щитовидной железы, где он продуцируется в норме, но и в паренхимальных клетках печени, почек, легких, мышечной ткани, в адипоцитах, которые, в отличие от С-клеток, не имеют специфических ферментов для расщепления ПКТ, что приводит к повышению его концентрации в крови. Показано, что у пациентов с вирусной инфекцией или воспалительными заболеваниями содержание маркера остается постоянно низким, что делает целесообразным определение ПКТ для диагностики и прогноза течения бактериальной инфекции [1]. При целом ряде воспалительных патологий не бактериальной этиологии значения ПКТ остаются все время низкими, в отличие от других маркеров воспаления (скорость оседания эритроцитов, концентрации С-реактивного белка, интерлейкина-6) [2]. Повышение уровня ПКТ происходит только в случае присоединения бактериальной инфекции, что позволяет дифференцировать обострение основного заболевания и наличие инфекции.

В США количественное определение уровня ПКТ предложено в качестве основного теста при принятии решения о назначении и/или отмене антибиотиков у пациентов с сепсисом или инфекциями дыхательных путей. При использовании алгоритмов, основанных на определении уровня ПКТ, было отмечено сокращение частоты назначения антибиотиков (на 11-74% по данным разных исследований), а также уменьшение продолжительности их применения (на 15-55%) [3]. При этом не было отмечено ухудшения исходов лечения в исследуемой группе больных по сравнению с контрольной группой: общая частота летальных исходов составила 7,7% и 8,3%, соответственно [3]. Очень важно проводить диагностику бактериальных инфекций и мониторинг антибиотикотерапии, имея надежный тест для количественного определения ПКТ. Наиболее чувствительным, специфичным и доступным методом определения белков острой фазы, цитокинов и других диагностически значимых факторов стал метод иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием антител.

Разработка отечественного теста для количественного определения прокальцитонина методом ИФА неразрывно связана с получением рекомбинантного ПКТ человека, пригодного для иммунизации животных, что является целью настоящей работы.

**Методы исследования.** В качестве матрицы для дизайна олигонуклеотидов для синтеза гена была использована аминокислотная последовательность препрокальцитонина (genbank, GI:4502545). Поскольку кодонный состав человека и *Escherichia coli* существенно различается, была проведена оптимизация кодонной последовательности для экспрессии целевого белка в *E. coli*. Для оптимизации использовали программное обеспечение Genedesign (DNA2.0, США). Ген собирали из олигонуклеотидов методом перекрывающейся ПЦР. Олигонуклеотиды подбирали с применением программного TmPrime (<http://prime.ibn.a-star.edu.sg/input.php> дата обращения 13.02.2014).

Полученный в результате сборки линейный фрагмент с размером 360 п.о., содержащий на 5'- и 3'- концах сайты узнавания рестрикционных эндонуклеаз BamH I и Xho I обрабатывали соответствующими эндонуклеазами рестрикции и клонировали в составе

вектора рЕТ 28а (Novagen, США) в клетках *E. coli BL21(DE3)* с получением штамма *E. coli* РКТ1, продуцирующего белок fusion 1. Данный белок идентичен по аминокислотной последовательности нативному ПКТ и дополнительно содержит остатки из 6 гистидинов как на С, так и на N-конце.

Клетки *E. coli* выращивали на термостатированных биологических качалках с частотой колебания платформы 170–190 об/мин при +25° С на среде (0,5 л) следующего состава: триптон – 1%, дрожжевой экстракт – 0,5 %, глюкоза – 0,5 %, NaCl – 1%. В среду дополнительно вносили канамицин до 50 мкг/мл. Клетки выращивали до оптической плотности 1,5 ( $\lambda = 600$  нм), затем проводили индукцию синтеза белка путем внесения изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до концентрации 0,1 мМ и продолжали культивирование в течение 4 ч. По окончании культивирования клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при  $5000 \times g$ . Осадок клеток ресуспендировали в 50 мл лизирующего буфера, содержащего 50 мМ  $\text{NaN}_2\text{PO}_4$ , 400 мМ NaCl и 20 мМ имидазол (рН 8,0). Ультразвуковую дезинтеграцию клеток осуществляли на приборе Branson Sonifier 450 при мощности 40-50 Вт (360 импульсов по 0,5 сек).

После центрифугирования образца при  $20000 \times g$  в течение 30 мин супернатант наносили на хроматографическую колонку ( $l= 48$  мм,  $d= 20$  мм) с 4 мл смолы Profinity IMAC (“Biorad”, США). Колонку промывали 10-ю объемами лизирующего буфера. Белок элюировали 3-мя объемами буфера, содержащего 50 мМ  $\text{NaN}_2\text{PO}_4$ , 400 мМ NaCl и 500 мМ имидазол (рН 8,0). Раствор белка подвергали диализу против 1000-кратного объема буфера следующего состава:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,7 мМ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 5,2 мМ, NaCl – 150 мМ рН 7,4 и стерилизовали фильтрованием.

Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили с иммобилизованным на твердой фазе антигеном с последующей инкубацией с первичными специфическими антителами и вторичными анти-видовыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена.

**Результаты исследований.** Собран ген, кодирующий прокальцитонин человека. Полученный ген, клонирован в составе вектора рЕТ28а+ в клетках *E. coli BL21 (DE3)*.

Оптимизированы условия экспрессии целевого белка в созданном штамме-продуценте: внесение индуктора (ИПТГ) при достижении клетками оптической плотности – 1,5 ( $\lambda = 600$  нм), температура культивирования – 30 °С, длительность индукции – 4 часа после внесения индуктора, концентрация индуктора – 0,1 мМ. Подобраны условия экспрессии рекомбинантного модифицированного ПКТ (fusion 1) позволили увеличить выход белка с 1 литра культуры в 1,5 раза с 16 до 24 мг белка.

Разработана схема очистки белка fusion 1 с использованием одноэтапной металло-аффинной хроматографии.

Наработан рекомбинантный модифицированный ПКТ в количестве 7 мг с чистотой более 90% и выходом целевого белка 60%.

Антигенные свойства полученного белка fusion1 проанализированы методом ИФА с помощью кроличьих поликлональных антител, специфичных к ПКТ человека («Daco») (рисунок 1). Рекомбинантный белок fusion 1 не отличался от рекомбинантного ПКТ («Shenandoah Biotechnology», США) по способности связываться со специфическими антителами в ИФА.

Для оценки иммуногенных свойств полученного белка fusion 1 проведена иммунизация мышей линии BALB/c в присутствии полного или неполного адьюванта Фрейнда при первой и последующих иммунизациях, соответственно. Забор крови для исследования проводили из хвостовой вены на десятые сутки после иммунизации. Наличие специфических антител в плазме крови иммунизированного животного определяли методом ИФА. Анализ полученных данных показал, что, полученный рекомбинантный белок fusion 1, способен индуцировать образование специфических антител, титр которых растет с увеличением количества иммунизаций (рисунок 2). Важно отметить, что при иммунизации рекомбинантным модифицированным белком fusion 1 около 60-70% специфических антител

наряду с использованным нами иммуногеном распознавали и рекомбинантный ПКТ человека.

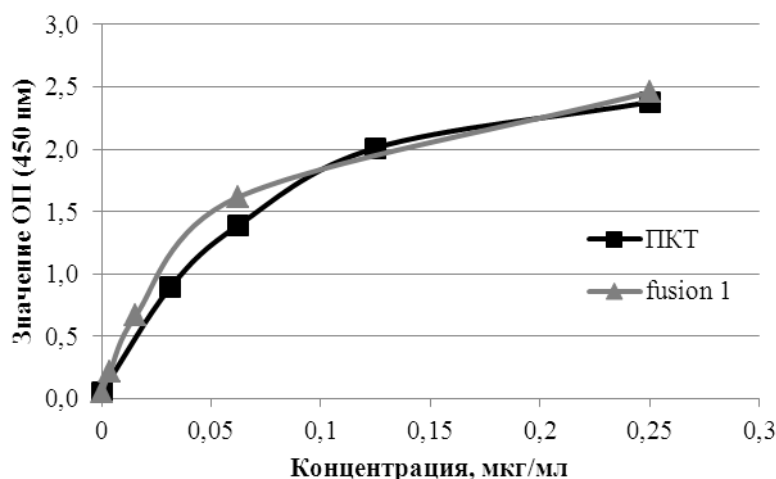


Рисунок 1 – Характеристика антигенной активности молекул ПКТ и fusion 1 методом ИФА

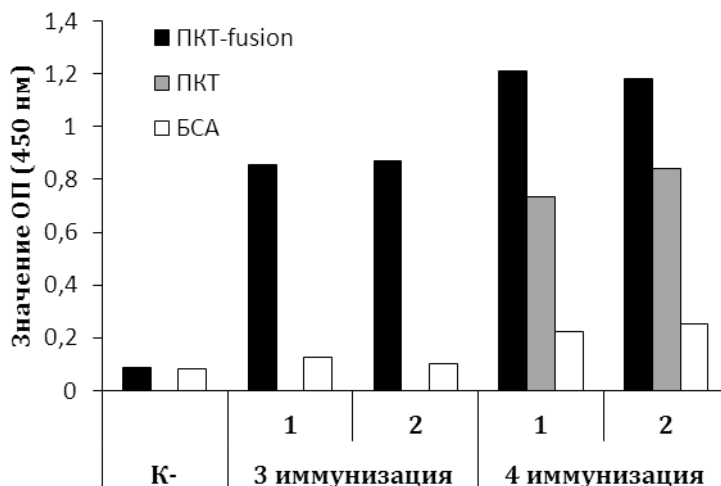


Рисунок 2 – Увеличение количества специфических антител в плазме крови иммунизированных мышей. Представлены средние значения оптической плотности дуплета, полученные в ИФА с иммобилизованным на твердой фазе ПКТ, fusion 1 и БСА (бычий сывороточным альбумином) в концентрации 0,25 мкг/мл и плазмой крови мыши (номер 1, 2) в разведении 1:500. К- – плазма крови контрольной неиммунизированной мыши.

**Заключение.** Создан штамм-продуцент, экспрессирующий рекомбинантный модифицированный прокальцитонин человека. Нароботан препарат белка fusion 1 (чистота более 90%), который по антигенным свойствам не отличается от коммерчески доступного рекомбинантного ПКТ и обладает достаточной иммуногенностью, чтобы быть использованным для иммунизации животных с целью получения специфических антител.

#### Литература

1. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: clinical utility and limitations / K.L. Becker [et al.] // Crit. Care Med. – 2008. – Vol. 36. – P. 941-952.
2. Applying biomarkers to clinical practice: a guide for utilizing procalcitonin assays / J. Foushee [et al.] // J. Antimicrob. Chemother. – 2012. – Vol. 67. – P. 2560–2569.

3. Procalcitonin algorithms for antibiotic therapy decisions: a systematic review of randomized controlled trials and recommendations for clinical algorithms / P. Schuetz [et al.] // Arch. Intern. Med. – 2011. – Vol. 171. – P. 1322-1331.

**Production of recombinant human procalcitonin and studying of its immunogenic properties**

Kvach S.V.<sup>1</sup>, Rymko A.N.<sup>1</sup>, Radevich D.S.<sup>1</sup>, Zinchenko A.I.<sup>1</sup>, Akalovich S.T.<sup>2</sup>, Doroshenko T.M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Microbiology, National Academy of Sciences, Belarus e-mail: zinch@mbio.bas-net.by*

<sup>2</sup> *The Republic Research & Production Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies; e-mail: dor\_t\_m@mail.ru*

**Abstract**

The measurement of plasma procalcitonin is used as a marker for bacterial infections and sepsis. To develop a sensitive immunoassay for its detection we produced recombinant modified procalcitonin and examined its properties. Here in we describe a rapid, cheap and facile production of recombinant procalcitonin suitable for mice immunization. DNA encoding N- and C-terminally His-tagged procalcitonin was cloned into the pET28a+ vector. Recombinant modified procalcitonin was expressed in *Escherichia coli* in soluble state. Total yield of purified procalcitonin was 7 mg from half a liter. The antigenic and immunogenic properties of the produced protein were similar to that of the commercial recombinant procalcitonin.