

Оригинальные работы

УДК 57.083.3

Ю.С. НИКОЛАЕВ¹, П.В. ГИЛЬЧУК², О.Б. ГОРБАТЮК³,
А.И. ФЛЯК³, А.Ю. ЛАБЫНЦЕВ⁴, Д.М. ИРОДОВ²,
Д.В. КОЛИБО⁴, В.А. КОРДЮМ²

¹ Институт генетической и регенеративной медицины
АМН Украины, Киев

² Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

³ Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко

⁴ Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев

ПОЛИКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ПОВЕРХНОСТНОГО КЛЕТОЧНОГО МАРКЕРА CD34 ЧЕЛОВЕКА



Разработан высокоэффективный и недорогой лабораторный способ получения и очистки поликлональных антител против поверхностного клеточного маркера CD34 человека. Показано, что клонированный в клетки E. coli негликозилированный рекомбинантный белок, содержащий внеклеточный фрагмент антигена CD34 человека, при выделении из бактерий сохраняет необходимые антигенные детерминанты и при иммунизации индуцирует продукцию специфических поликлональных антител, способных распознавать нативный антиген на поверхности клеток. Полученные антитела могут быть использованы для фенотипирования CD34⁺ клеток методами иммуноцитохимии и проточной цитометрии.

© Ю.С. НИКОЛАЕВ, П.В. ГИЛЬЧУК, О.Б. ГОРБАТЮК,
А.И. ФЛЯК, А.Ю. ЛАБЫНЦЕВ, Д.М. ИРОДОВ,
Д.В. КОЛИБО, В.А. КОРДЮМ, 2011

Введение. Поверхностный клеточный маркер CD34 является гликопротеином с молекулярной массой ~110 кДа, который представлен на поверхности гематопозитических стволовых клеток и клеток эндотелия сосудов микроциркуляторного русла, на клетках внутренних органов эмбриона, клетках-предшественниках стромы костного мозга, на опухолевых клетках миелоидной и лимфоидной природы, а также опухолях, имеющих эпителиальное происхождение [1]. В связи с интенсивным изучением гематопозитических стволовых клеток, их использованием в медицине, а также разработкой новых способов диагностики раковых заболеваний широкое распространение получили системы идентификации и выделения популяции CD34⁺ клеток с использованием специфических моноклональных антител [2].

В составе внеклеточного фрагмента CD34 идентифицированы девять потенциальных сайтов гликозилирования по остаткам аспарагина, а также сайты гликозилирования по остаткам серина и треонина. Семь из девяти сайтов N-гликозилирования, большинство сайтов O-гликозилирования локализованы на N-концевом домене внеклеточного фрагмента CD34 [1]. Кроме того, в составе внеклеточного фрагмента CD34 присутствует C-концевой домен, имеющий глобулярную природу. Такая структура антигена обуславливает разнообразие эпитопов, к которым потенциально могут быть получены моноклональные антитела. На сегодня описано более двух десятков различных моноклональных антител против CD34, которые условно разделяют на три класса по их эпитопной специфичности.

Антитела 1-го класса распознают эпитопы внеклеточного фрагмента, подвергающиеся гидролизу при обработке как нейраминидазой из *Vibrio cholera*, гидролизующей кетозидные связи концевых остатков сиаловой кислоты в олигосахаридах, так и O-сиалогликопротеин эндопептидазой (гликопротеазой) из *Pasteurella haemolytica*. Соответственно, антитела 1-го класса распознают эпитопы, имеющие в своем составе сиалилированные O-гликаны. Антитела 2-го класса способны распознавать CD34 после обработки нейраминидазой, однако теряют это свойство после обработки антигена гликопротеазой. Это позволяет предположить наличие соответствующих эпитопов на высокогликозилированном N-концевом домене внекле-

точного фрагмента CD34 по соседству с чувствительными к действию нейраминидазы эпитопами 1-го класса. В то же время антитела 3-го класса сохраняют способность распознавать CD34 после его обработки двумя упомянутыми ферментами. Эпитопы распознавания антител 3-го класса, предположительно, расположены на глобулярном домене в С-концевой части внеклеточного фрагмента CD34 [1].

Различная эпитопная специфичность антител против CD34 определяет их применимость для тех или иных методов иммунологического анализа. Значительная гетерогенность характера гликозилирования антигена CD34 на клетках разных тканей и клетках с различной степенью дифференцировки ограничивает применение антител 1-го и 2-го классов. Так, в связи с высокой полиморфностью гликозилсодержащих эпитопов CD34 для цитофлуориметрического анализа и фракционирования популяции CD34⁺ клеток в большинстве случаев используют антитела 3-го класса, которые распознают эпитопы, удаленные от сайтов гликозилирования. В то же время распознаваемые антителами 3-го класса эпитопы являются конформационными, поэтому в методах анализа, связанных с денатурацией CD34 (вестерн-блот, ИФА, парафиновые срезы тканей), как правило, применяют антитела 1-го и 2-го классов. При этом использование антител 2-го класса кажется предпочтительным вследствие их более высокой аффинности.

Впервые CD34 был детектирован на поверхности клеток миелобластоидной линии KG1a моноклональными антителами Mu10, полученными путем иммунизации мышей интактными клетками KG1a с последующим выделением соответствующей гибридомы [3]. В дальнейшем эта схема широко использовалась для получения антител против CD34 наряду с иммунизацией трансфицированными клетками эукариот, экспрессирующими ген полноразмерного CD34 [4]. Среди других подходов описаны иммунизация внеклеточным фрагментом CD34, полученным экспрессией в клетках млекопитающих [5], и ДНК-иммунизация животных вектором, экспрессирующим внеклеточный фрагмент CD34 [6]. Указанные подходы позволили получить анти-CD34 антитела всех трех классов.

Получение и отбор гибридом является длительным процессом, а продукция и очистка моноклональных антител необходимой специфичности требует высоких затрат на среды и реактивы. Альтернативным способом является получение специфичных поликлональных антител путем иммунизации животных. Последний способ менее затратный, однако требует большого количества очищенного белка для иммунизации, что в свою очередь невозможно в случае использования клеточных экстрактов либо суспензий интактных CD34⁺ клеток. Использование для иммунизации внеклеточного фрагмента CD34, полученного экспрессией в клетках эукариот, также имеет свои недостатки. Среди них можно указать низкий уровень его синтеза клетками эукариот, длительность культивирования, нестабильность трансфицированной клеточной линии, высокую стоимость питательных сред, сложность получения и очистки препаративных количеств антигена в условиях лаборатории. Гетерогенный характер присоединения гликозильных остатков к полипептидной цепи CD34 в случае его синтеза клетками трансфицированной линии эукариот изменяет антигенные свойства CD34, что в свою очередь усложняет его использование в процедурах получения универсальных специфичных поли- и моноклональных антител против белковых детерминант.

В то же время генно-инженерные технологии позволяют клонировать гены эукариот и обеспечивать их высокоэффективную экспрессию в бактериях *E. coli*. Затем рекомбинантный белок может быть выделен из бактериальных клеток и очищен с использованием методов колоночной хроматографии. Таким способом рекомбинантный антиген CD34 может быть получен в количествах, необходимых для иммунизации животных, продуцирования специфичных поликлональных антител и их очистки. Поскольку два класса антител против CD34 из трех описанных распознают белковые антигенные детерминанты, нами было предложено использовать рекомбинантный белок на основе внеклеточного фрагмента антигена CD34 человека для получения поликлональных антител. Такой способ получения поликлональных антител кажется более предпочтительным по сравнению со способами, описанными выше.

Целью настоящей работы была разработка способа получения и очистки специфических поликлональных антител против белковых детерминант поверхностного клеточного маркера CD34 человека, характеристика полученных антител, а также исследование возможности их применения для иммунодетекции популяции CD34⁺ клеток.

Материалы и методы. В работе использовали вектор экспрессии pET-24a+ («Novagen», Германия), штаммы *E. coli* DH10B, BL21(DE3) и Rosetta 2(DE3) («Novagen», Германия). Дизайн праймеров для ПЦР осуществляли с помощью программы VectorNTI 5.0 («Invitrogen», США). Генно-инженерные манипуляции с ДНК проводили согласно методам, описанным Sambrook et al. [7]. Клетки линии KG1 миелобластоидного происхождения (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Институт цитологии РАН) культивировали в среде RPMI-1640 («Sigma», США), содержащей 20%-ную эмбриональную бычью сыворотку («Invitrogen», США), как описано в работе [8].

Клонирование κДНК антигена CD34 человека. Фракцию поли-А(+)РНК выделяли из клеток KG1 с использованием набора реактивов «QuickPrep Micro mRNA Purification Kit» («GE Healthcare», США) согласно рекомендациям производителя. Синтезировали κДНК в реакции обратной транскрипции с применением вырожденных гексануклеотидных праймеров и использовали как матрицу для ПЦР с праймерами Sense-CD34 (5'-ATC TGA ATT CAT ATG ATG AGT CTT GAC AAC AAC GG-3') и Antisense-CD34 (5'-TCA ATC TCG AGG GTC TTT TGG GAA TAG CTC T-3'), содержащими сайты эндонуклеаз рестрикции NdeI и XhoI. Амплификацию проводили при следующих условиях: 30 циклов при 95 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 60 с. Полученную ДНК гидролизировали соответствующими рестриктазами, лигировали с вектором pET-24a+ и использовали для трансформации *E. coli* BL21(DE3).

Экспрессия рекомбинантного белка rhExCD34 в *E. coli*. Для этого использовали модифицированный протокол аутоиндукции [9]. Бактерии инокулировали в среду 2xYT (17 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л NaCl), содержащую 50 мкг/мл канамицина и 1%-ную глюкозу, и наращивали 14–16 ч при 37 °С. Ноч-

ную культуру инокулировали в соотношении 1:1000 в среду 2xYT, содержащую 50 мкг/мл канамицина, 25 мМ (NH₄)₂SO₄, 50 мМ KH₂PO₄, 50 мМ Na₂HPO₄, 1 мМ MgSO₄, 0,05 % глюкозу, 0,2 % α-лактозу, 0,5 % глицерол. Ферментацию проводили 18–24 ч при 37 °С, затем клетки осаждали центрифугированием 20 мин при 3000 g. Для получения фракции растворимых и нерастворимых белков *E. coli* осадок клеток *E. coli* суспендировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ): 0,14 М NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,8 мМ KH₂PO₄, pH 8,0. После одного цикла замораживания/размораживания клетки разрушали ультразвуком. Разделение фракций осуществляли центрифугированием 12000 g в течение 5 мин. Локализацию рекомбинантного белка в клетках определяли методом электрофореза в ДСН-ПААГ с последующей детекцией иммуноблоттингом. Тельца включения выделяли с использованием ранее описанного метода [10]. Электрофоретический анализ белков проводили в 12%-ном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН-ПААГ) по Laemmli [11]. Количество белка и его чистоту определяли денситометрией гелей с помощью программы Image Master 1D Prime («Pharmacia», Швеция), используя в качестве стандарта БСА с известной концентрацией.

Очистка и ренатурация rhExCD34. Для очистки и ренатурации рекомбинантного белка использовали метод металл-аффинной хроматографии. Тельца включения солибилизировали в 20 мМ Трис-НСl буфере (pH 8,0), содержащем 6 М гуанидин-гидрохлорид, 100 мМ Na₂HPO₄, 10 мМ имидазол и 10 мМ 2-меркаптоэтанол (конечная концентрация rhExCD34 – 1–2 мг/мл). Очистку и рефолдинг рекомбинантного белка проводили на 1 мл колонке Ni²⁺-NiTrap («GE Healthcare», США) с использованием хроматографа FPLC («Pharmacia», Швеция). Колонку уравнивали ФСБ, содержащим 8 М мочевины и 10 мМ имидазол. Солибализированные тельца включения наносили на колонку из расчета 1 мг белка/мл сорбента, колонку промывали буфером с мочевиной для удаления неспецифически связавшихся белков. Рефолдинг белка проводили в линейном нисходящем градиенте мочевины при скорости потока 0,2 мл/мин в 15 объемах колонки. Для рефол-

динга использовали буфер ФСБ, содержащий 1 мМ окисленный и восстановленный глутатион («Sigma», США). Ренатурированный белок элюировали буфером ФСБ, содержащим 0,3 М имидазол. Для препаративного рефолдинга rhExCD34 использовали колонку 26/20 ХК («GE Healthcare», США), содержащую 20 мл сорбента Ni-NTA Superflow («Qiagen», Нидерланды). Рефолдинг проводили при скорости потока 2,7 мл/мин. Фракции элюции анализировали электрофорезом в ПААГ.

Иммунизация животных. Для иммунизации использовали самок мышей линии BALB/c возрастом 2,5 мес ($n = 10$) и самок кролей породы шиншилла возрастом 3 мес ($n = 3$). Очищенный растворимый rhExCD34 (для мышей доза составила 80 мкг) вводили подкожно при первом и втором введении, интерперитонеально при третьем введении согласно следующей схеме: первое введение осуществляли с полным адьювантом Фрейнда («Sigma», США), второе – с неполным («Sigma», США), третье – без адьюванта, с интервалом соответственно 14 и 7 дней. Кролей иммунизировали под лопатки и подкожно вдоль позвоночника рекомбинантным белком, который вводили с полным адьювантом Фрейнда в дозе 200 мкг, с неполным адьювантом и без адьюванта – 100 мкг с интервалами в 14 дней. По завершении иммунизации отбирали кровь и использовали для получения сыворотки, а также для определения титра специфических антител. Все манипуляции с животными осуществляли с использованием седативных и анестезирующих препаратов согласно ветеринарному законодательству.

Анализ связывания поликлональных антител с rhExCD34. В лунках полистиролового планшета для ИФА MaxiSorp («Nunc», Дания) сорбировали очищенный ренатурированный rhExCD34 (10 мкг/мл). Блокирование неспецифического связывания и промывки проводили буфером ФСБ, содержащим 0,1 % Твин 20 (ФСБТ). Гипериммунные сыворотки последовательно разводили ФСБТ, вносили в соответствующие лунки планшета и инкубировали 1 ч при 37 °С, после чего проводили инкубацию со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена против связавшихся иммуноглобулинов. В качестве хромогенного субстрата использовали 3,3',5,5'-тетра-

метилбензидин («Sigma», США). После развития окраски реакцию останавливали внесением 1 М серной кислоты и измеряли величину адсорбции A_{450} на многоканальном фотометре Multiscan MCC/340 («Titertek», США). Для иммуоблотинга белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond ECL («Amersham Biosciences», Германия) и проявляли с использованием описанной системы иммунореагентов. В качестве хромогенного субстрата использовали 4-хлоро-1-нафтол («Sigma», США).

Очистка поликлональных антител против rhExCD34. Очищенный и ренатурированный антиген диализовали против буфера ФСБ и иммобилизовали на BrCN-активированной сефарозе 4 Fast Flow («GE Healthcare», США) для получения аффинного сорбента. Все манипуляции проводили согласно рекомендациям производителя. Для очистки фракции специфических поликлональных антител иммунную сыворотку разводили в 10 раз буфером ФСБ, наносили на уравновешенный соответствующим буфером сорбент и инкубировали 2 ч при постоянном перемешивании. Сорбент промывали буфером ФСБ, связанные антитела элюировали буфером, содержащим 0,1 М глицин-HCl, 0,5 М NaCl, pH 2,0. Фракции элюции нейтрализовали 1 М Трис. Связывание антител с rhExCD34 анализировали методами ИФА и иммуоблотинга, с поверхностным клеточным CD34 – методами иммуоцитохимии и точной цитометрии.

Для получения препаративного количества специфических поликлональных антител из сыворотки иммунных кролей использовали модифицированный метод металл-аффинной хроматографии. Иммуноглобулины из 5 мл гипериммунной сыворотки осаждали 3,9 М сульфатом аммония (pH 7,9), осадок иммуноглобулинов растворяли в 5 мл буфера 1 (25 мМ HEPES-Na, pH 7,9; 150 мМ NaCl, 10 мМ имидазол; 0,1 % тритон X-100; 10 % глицерол), вносили 1 мл сорбента Ni-NTA Superflow с иммобилизованным очищенным и рефолдированным rhExCD34 (см. очистка и ренатурация rhExCD34). Связывание иммуноглобулинов с иммобилизованным рекомбинантным белком проводили в течение 16 ч при перемешивании при +4 °С. Затем сорбент два раза промывали в 10 мл буфера 2 (25 мМ HEPES-Na,

pH 7,9; 150 mM NaCl; 0,1 % Triton X-100; 10 % глицерол). Элюцию иммуноглобулинов с сорбента проводили буфером 25 mM PIPES-Na, pH 6,8; 150 mM NaCl, 3,5 M MgCl₂; 0,1 % тритон X-100; 10 % глицерол. Элюированные антитела диализировали против буфера 2. Связывание очищенных антител с rhExCD34 анализировали методом ИФА как описано выше.

Иммунохимическое окрашивание препаратов клеток. Суспензию клеток KG1 промывали два раза ФСБ, наносили на предметные стекла и фиксировали 2 мин в парах формалина. Эндogenous пероксидазу ингибировали путем помещения препаратов клеток в 3%-ный раствор H₂O₂ в ФСБ на 5 мин. В качестве первичных использовали аффинно очищенные поликлональные антитела (10 мкг/мл) и иммунную сыворотку в разных разведениях, которые наносили на препараты клеток и инкубировали 1 ч при 37 °С. Специфичность связывания антител с поверхностным антигеном CD34 человека определяли методом их конкурентного связывания в присутствии rhExCD34 в насыщающей концентрации (100 мкг/мл). Препараты промывали ФСБ и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Для визуализации иммунных комплексов использовали 3-амино-9-этилкарбазол.

Проточная цитометрия с использованием аффинно очищенных поликлональных антител против rhExCD34. Клетки KG1 ($5 \cdot 10^5$ на пробу) осаждали центрифугированием (300 g, 5 мин, 4 °С), ресуспендировали в буфере ФСБ, содержащем 1 % БСА и 0,05 % азида натрия (ФСБ/БСА/NaN₃), и инкубировали 30 мин при 4 °С с аффинно очищенными поликлональными антителами мыши при их концентрации 5, 10 и 20 мкг/мл. Клетки промывали буфером FACS и инкубировали с антителами против иммуноглобулинов мыши, конъюгированными с ФИТЦ (F(ab')₂-FITC, «Sigma», США). Связывание поликлональных антител с клетками анализировали с использованием проточного цитофлуориметра EPICS XL («Beckman Coulter», США). В качестве контроля на автофлюоресценцию для канала ФИТЦ использовали неокрашенные клетки. Экспрессию маркера CD34 на KG1 определяли с использованием ФИТЦ-конъюгированных моноклональных

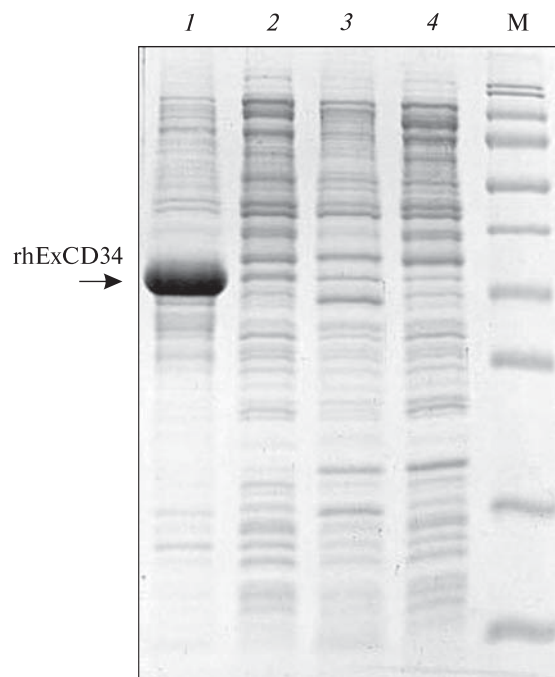


Рис. 1. Электрофореграмма лизатов клеток *E. coli* в 15 % ДСН-ПААГ: 1 – фракция нерастворимых белков клетки (тельца включения) после индукции экспрессии ИПТГ; 2 – фракция растворимых белков клетки после индукции экспрессии ИПТГ; 3, 4 – фракции нерастворимых и растворимых белков клетки соответственно при культивировании без индуктора экспрессии. Количество белков на дорожках соответствует 10 мкл клеточной суспензии *E. coli*. М – белки-маркеры молекулярной массы (сверху вниз: 160, 110, 90, 70, 55, 45, 35, 25, 15, 10 кДа)

антител против CD34 (клон 581, «Beckman Coulter», США). Специфичность связывания аффинно очищенных поликлональных антител с поверхностным антигеном CD34 человека определяли методом их конкурентного связывания в присутствии rhExCD34 в насыщающей концентрации (50 мкг/мл), а также инкубацией клеток KG1 с антителами F(ab')₂-FITC в отсутствие первичных антител. Анализ результатов проводили с использованием программного обеспечения указанного прибора.

Результаты исследований и их обсуждение. Для клонирования использовали кДНК внеклеточной части антигена CD34 человека (NCBI AAB25223) размером 783 пары нуклеотидов, которую получали в реакции обратной транскрипции из фракции мРНК клеток KG1

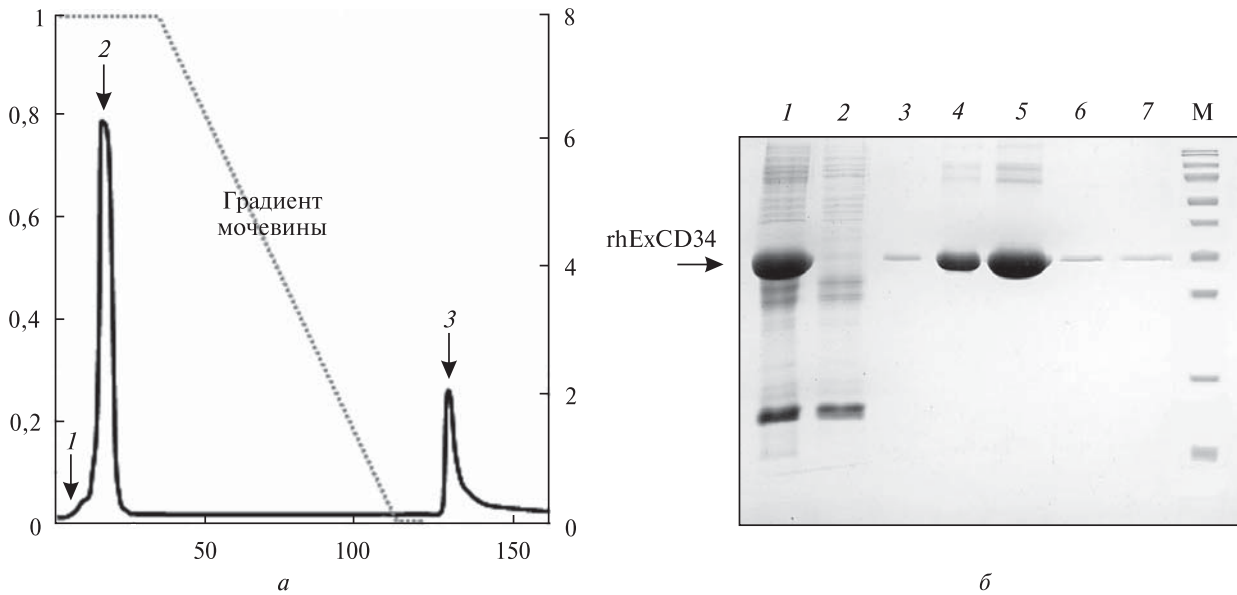


Рис. 2. Очистка и ренатурация rhExCD34 на металл-аффинном сорбенте: *a* – хроматограмма очистки rhExCD34; по горизонтали – V, мл; по вертикали слева – A_{280} , mAu; справа – концентрация мочевины, М; 1 – нанесение солюбилизованных телец включения; 2 – белки, не связавшиеся с сорбентом; 3 – элюция rhExCD34 0,3 М имидазолом; *б* – электрофореграмма фракций элюции rhExCD34 с металл-аффинной колонки: 1 – солюбилизованные тельца включения; 2 – белки, не связавшиеся с сорбентом; 3 – промывка колонки ФСБ, содержащим 100 мМ имидазол; 4, 5 – элюированный в присутствии 0,3 М имидазола rhExCD34; 6 – элюированный в присутствии 0,5 М имидазола rhExCD34; 7 – агрегировавший на колонке белок, элюированный в присутствии 8 М мочевины и 0,5 М имидазола. Разделение белков в 12 % ДСН-ПААГ. М – белки-маркеры молекулярной массы (сверху вниз: 160, 110, 90, 70, 55, 45, 35, 25, 15, 10 кДа)

миелобластоидного происхождения. Предварительный иммунофлуоресцентный анализ с использованием моноклональных антител против CD34 человека показал, что более 80 % клеток KG1 экспрессируют целевой антиген. кДНК клонировали в вектор для бактериальной экспрессии рЕТ-24a+, содержащий сильный регулируемый промотор для ДНК-полимеразы бактериофага Т7 и ген резистентности к канамицину. Уникальные сайты рестриктаз NdeI и XhoI, фланкирующие 5' и 3'-концы целевого гена, были введены для возможности экспрессии рекомбинантного белка с первой аминокислоты, следующей за сигнальным пептидом в последовательности нативного антигена, а также для совмещения с рамкой считывания последовательности аффинной «метки» 6His-tag, кодируемой вектором. Последовательности трансмембранного (а.к. 291–311) и цитоплазматического (а.к. 312–385) доменов CD34 были исключены при конструировании рекомбинантного антигена, что связано с их относи-

тельной межвидовой инвариантностью, а также несущественным вкладом в антигенные свойства рекомбинантного белка в случае получения антител против CD34. Секвенированием было подтверждено соответствие последовательности клонированного гена ожидаемой. Для получения рекомбинантного белка использовали высокоэффективную систему экспрессии, основанную на использовании штамма *E. coli* BL21 (DE3), содержащего ген ДНК-полимеразы бактериофага Т7. Предварительный анализ клеточных лизатов показал, что целевой белок при экспрессии в стандартных условиях накапливается в нерастворимой клеточной фракции – тельцах включения (рис. 1). Оптимизация условий ферментации (время инкубации, температура, концентрация индуктора изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ)) не привели к накоплению белка в растворимой форме. Следует отметить, что последнее может быть связано как с необходимостью посттрансляционных модификаций (антиген CD34 че-

ловека высокогликозилирован), так и со сложной третичной структурой CD34 (наличие нескольких доменов во внеклеточной части, а также трех дисульфидных мостиков). В то же время экспрессия рекомбинантного белка в тельца включения обладает рядом преимуществ, среди которых можно указать высокий уровень его накопления продуцентом (до 50 % от суммарного белка *E. coli*), отсутствие протеолиза, относительную простоту выделения тельца включения и высокую чистоту целевого белка в этой фракции, а также возможностью выделения функционального и растворимого белка ренатурацией *in vitro*. Исходя из сказанного, упомянутая система экспрессии является перспективной для получения препаративного количества рекомбинантного антигена CD34. Дальнейшая работа была посвящена оптимизации экспрессии rhExCD34 продуцентом, что включало ферментацию с использованием среды для аутоиндукции (см. «Материалы и методы»), а также экспрессию rhExCD34 в *E. coli* штамма Rosetta 2(DE3), содержащего тРНК для трансляции редких эукариотических кодонов.

При аутоиндукции для ферментации использовали питательную среду, содержащую неорганические соли, глицерол как источник углерода, глюкозу и альфа-лактозу (индуктор экспрессии) в определенных концентрациях [9]. За счет пролонгирования экспоненциальной фазы роста (18–24 ч) этот способ позволяет получать суспензионные культуры высокой плотности, что в случае использования регулируемой T7-системы экспрессии приводит к повышению выхода рекомбинантного белка. По данным литературы продуценты, культивируемые в среде для аутоиндукции, являются более стабильными и способны экспрессировать рекомбинантный белок в течение 24 ч и более без применения специализированного оборудования для ферментации. Учитывая также простоту применения в условиях лаборатории и невысокую стоимость используемых компонентов среды, мы рассматриваем описанный способ как наиболее предпочтительный для продукции rhExCD34. Электрофоретический анализ лизатов бактериальных клеток показал, что уровень экспрессии rhExCD34 относительно суммарных клеточных белков составляет около 20 %.

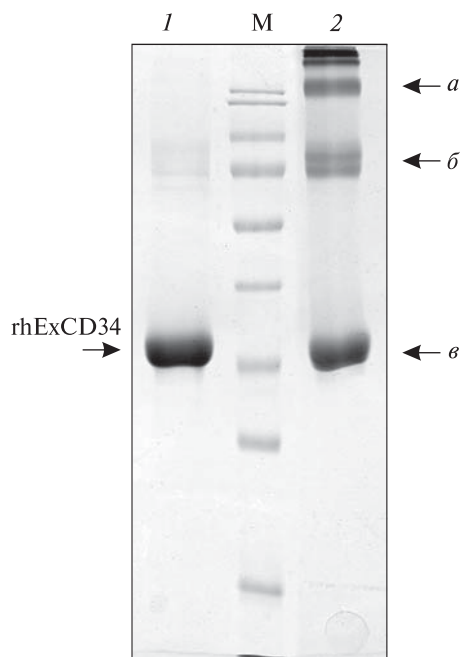


Рис. 3. Формирование дисульфидных связей в rhExCD34 после ренатурации: 1 – ренатурированный белок rhExCD34 после восстановления дисульфидных связей в присутствии 100 мМ 2-меркаптоэтанола; 2 – ренатурированный белок rhExCD34 без восстановления дисульфидных связей; а, б, в – высокомолекулярные, димерная и мономерная формы rhExCD34. Разделение белков в 12 % ДСН-ПААГ; М – белки-маркеры молекулярной массы (сверху вниз: 160, 110, 90, 70, 55, 45, 35, 25, 15, 10 кДа)

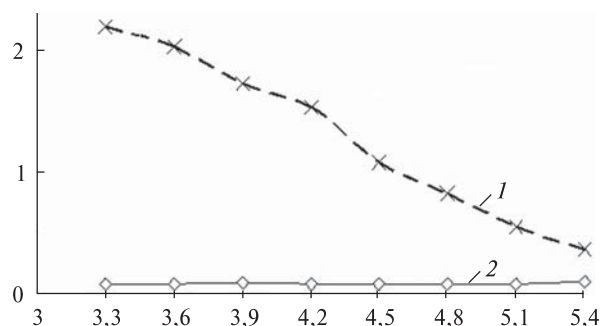


Рис. 4. Кривая связывания иммуноглобулинов из сывороток с rhExCD34, полученная с использованием метода ИФА: 1 – иммунная сыворотка; 2 – неиммунная сыворотка; по вертикали – оптическая плотность при длине волны 450 нм; по горизонтали – отрицательный десятичный логарифм разведения сыворотки. Приведены типичные результаты титрования иммунной сыворотки для группы из десяти иммунизированных rhExCD34 мышей

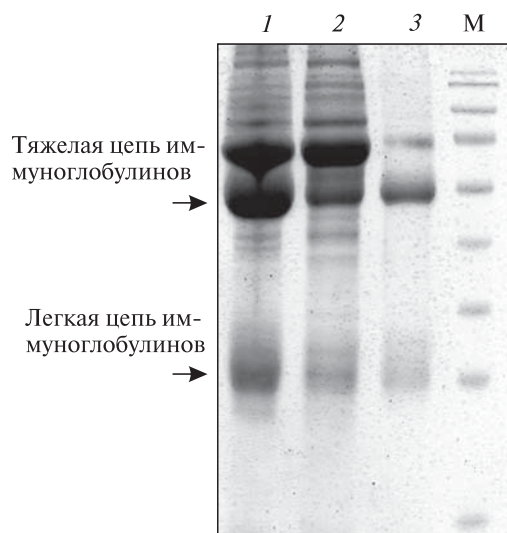


Рис. 5. Электрофореграмма фракций элюции иммуноглобулинов с аффинной колонки: 1 – наносимые на колонку белки сыворотки крови; 2 – белки, не связавшиеся с сорбентом; 3 – элюированные иммуноглобулины. Разделение белков проводили в 12 % ДСН-ПААГ; М – белки-маркеры молекулярной массы (сверху вниз: 160, 110, 90, 70, 55, 45, 35, 25, 15 кДа)

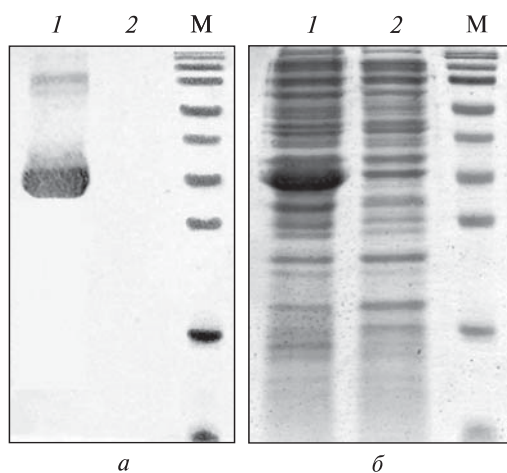


Рис. 6. Вестерн-блот анализ связывания очищенных поликлональных антител с rhExCD34 в лизатах клеток-продуцентов (а) и электрофореграмма лизатов клеток *E. coli* в 15 % ДСН-ПААГ (б): 1 – лизированные клетки-продуценты rhExCD34 после индукции экспрессии ИПТГ; 2 – лизированные клетки-продуценты rhExCD34 после культивирования без индуктора экспрессии. Количество белков на дорожках соответствуют 10 мкл клеточной суспензии *E. coli*. М – белки-маркеры молекулярной массы (сверху вниз: 160, 110, 90, 70, 55, 45, 35, 25, 15, 10 кДа)

Анализ последовательности мРНК рекомбинантного антигена показал наличие восьми кодонов для аминокислот Arg и Leu, которые плохо транслируются в *E. coli* – два AGG, два AGA, один CGA, три CUA – с частотами встречаемости в мРНК *E. coli* соответственно 0,14; 0,21; 0,31; 0,32 % [12]. Для исследования возможности дальнейшей оптимизации экспрессии плазмидой с кДНК rhExCD34 трансформировали штамм *E. coli* Rosetta 2(DE3), который содержит тРНК, распознающие редкие кодоны. Количественный анализ экспрессии rhExCD34 показал одинаковый уровень его синтеза в клетках штаммов BL21(DE3) и Rosetta2(DE3) (данные не представлены). В дальнейшем экспрессию rhExCD34 проводили в штамме BL21(DE3).

Поскольку процедуры иммунизации животных, выделения и характеристики фракции специфических поликлональных антител требуют больших количеств антигена в очищенной и растворимой форме, необходимым этапом является разработка и оптимизация способа получения rhExCD34. Наличие последовательности шести гистидинов (6His-tag) в составе рекомбинантного белка позволяет проводить его высокоэффективную очистку в денатурирующих условиях после солиubilизации телец включения. Ранее нами описан метод ренатурации рекомбинантных белков на металл-аффинной колонке, который позволяет автоматизировать процессы ренатурации и очистки, а также осуществлять их в одну стадию [13]. Принцип метода заключается в том, что рекомбинантный белок, солиubilизированный из телец включения с использованием мочевины или гуанидингидрохлорида, иммобилизуется на металл-аффинной колонке, уравновешенной ионами Ni²⁺. Градиентное удаление мочевины с использованием автоматизированного хроматографа приводит к ренатурации иммобилизованного белка. Ренатурированный белок элюируют с колонки в неденатурирующих условиях с использованием имидазола (рис. 2, а). Простота и технологичность, а также возможность оптимизации условий ренатурации индивидуальных белков с учетом особенностей их структуры позволяет рассматривать описанный подход как универсальный для получения 6His-tag-содержащих

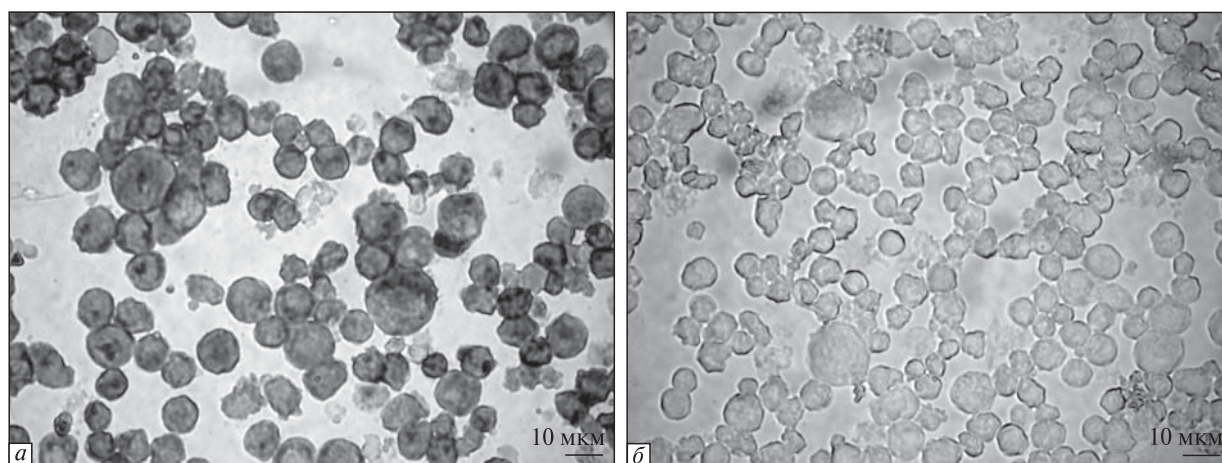


Рис. 7. Иммунохимическое окрашивание препаратов клеток KG1: *а* – окрашивание клеток с использованием поликлональных антител; *б* – окрашивание клеток поликлональными антителами в присутствии rhExCD34 в качестве конкурентного антигена

белков в препаративных количествах. С учетом описанных особенностей третичной структуры антигена CD34 изначальный способ получения белка ренатурацией на металл-аффинном сорбенте был модифицирован, что заключалось в следующем: при солиubilизации телец включения вносили 2-меркаптоэтанол для предотвращения спонтанного окисления SH-групп цистеина. В буфер для рефолдинга, который использовался для формирования нисходящего градиента мочевины, добавляли пару реагентов «глутатион окисленный/восстановленный» для образования дисульфидных связей, присутствующих в нативном CD34. Использование ступенчатого градиента имидазола позволило оптимизировать условия элюции ренатурированного белка и определить условия получения растворимого rhExCD34 с чистотой выше 90 % (рис. 2, б).

Поскольку одна из задач настоящей работы заключалась в получении рекомбинантного аналога CD34 человека, который сохраняет антигенные детерминанты, свойственные нативному антигену, важным этапом являлось определение содержания мономерной формы с корректно сформированными дисульфидными связями во фракции ренатурированного белка. Наличие таких детерминант в составе рекомбинантного антигена является необходимым условием получения специфических поликлональных антител против конформа-

ционных эпитопов нативного антигена, в случае использования описанной нами стратегии. Как было упомянуто ранее, антиген CD34 содержит три дисульфидных мостика, которые, по-видимому, участвуют в формировании трех субдоменов во внеклеточной части молекулы. Методом электрофореза в ДСН-ПААГ в нередуцирующих условиях было показано, что ~40 % rhExCD34 находится в мономерной форме (рис. 3). Такой подход, основанный на определении содержания мономерной формы [14], является одним из косвенных критериев успешности ренатурации белка. Также было продемонстрировано, что ренатурированный белок концентрацией 1–2 мг/мл не агрегирует длительное время в условиях хранения при +4 °С.

Очищенный ренатурированный белок использовали в процедурах иммунизации. Титр антител, специфичных к rhExCD34, в сыворотках иммунизированных животных определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) (рис. 4).

Выделение фракции специфичных поликлональных антител против rhExCD34 из гипериммунных сывороток проводили с помощью аффинной хроматографии на BrCN-активированной сефарозе с иммобилизированным рекомбинантным антигеном. Для получения препаративного количества поликлональных антител из сыворотки иммунных кролей использовали модифицированный метод ме-

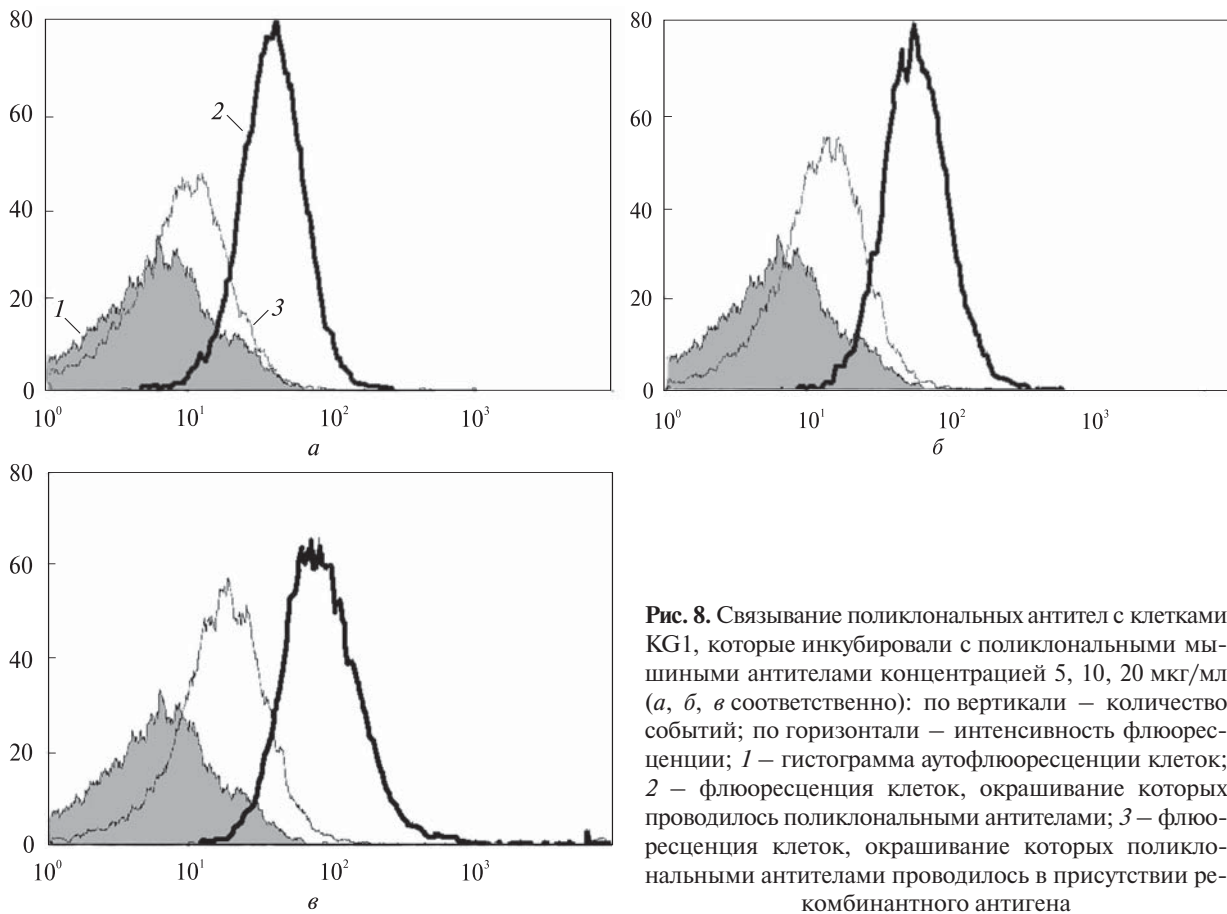


Рис. 8. Связывание поликлональных антител с клетками KG1, которые инкубировали с поликлональными мышиными антителами концентрацией 5, 10, 20 мкг/мл (а, б, в соответственно): по вертикали — количество событий; по горизонтали — интенсивность флюоресценции; 1 — гистограмма аутофлюоресценции клеток; 2 — флюоресценция клеток, окрашивание которых проводилось поликлональными антителами; 3 — флюоресценция клеток, окрашивание которых поликлональными антителами проводилось в присутствии рекомбинантного антигена

талл-аффинной хроматографии. rhExCD34 ренатурировали на металл-аффинном сорбенте, как описано в «Материалах и методах». Указанный сорбент с иммобилизованным рекомбинантным антигеном инкубировали с фракцией иммуноглобулинов, полученной из иммунных сывороток кролей, и промывали от несвязавшихся белков. Элюцию специфических к rhExCD34 поликлональных антител проводили буфером, содержащим 3,5 М MgCl₂. Указанные условия обеспечивают селективную десорбцию связавшихся с рекомбинантным антигеном антител. Благодаря высокой емкости металл-аффинного сорбента, а также эффективности схем иммобилизации и элюции специфических поликлональных антител, этот метод позволяет получать антитела высокой степени чистоты в препаративном количестве (рис. 5). Связывание поликлональных антител с rhExCD34 анализировали методом вестерн-блоттинга (рис. 6).

Поскольку антитела были получены иммунизацией и последующей очисткой с использованием рекомбинантного антигена, важным этапом работы было исследование их связывания с нативным антигеном CD34 на поверхности интактных и фиксированных клеток. Специфичность была показана в иммуноцитохимических экспериментах, которые включали конкурентное связывание аффинно очищенных антител, а также иммунных сывороток с фиксированными препаратами клеток KG1 в присутствии насыщающей концентрации рекомбинантного антигена (рис. 7).

Для оценки связывания поликлональных антител с интактными клетками, экспрессирующими маркер CD34, использовали метод проточной цитометрии. Визуализацию образовавшихся иммунных комплексов проводили вторичными ФИТЦ-мечеными антителами. Специфичность связывания поликлональных

антител с клеточным CD34 анализировали методом конкурентного связывания в присутствии насыщающей концентрации рекомбинантного антигена и различных концентраций поликлональных антител (рис. 8). Эксперименты по конкурентному связыванию поликлональных антител в присутствии рекомбинантного антигена показали снижение флуоресценции вплоть до уровня отрицательного контроля (неокрашенные антителами клетки KG1), что подтверждает специфичность аффинно очищенных поликлональных антител к белковым антигенным детерминантам нативного антигена CD34.

Таким образом показано, что полученный нами негликозилированный рекомбинантный белок ghExCD34 сохраняет антигенные детерминанты, свойственные нативному антигену CD34 человека, и при иммунизации индуцирует продукцию специфических поликлональных антител, способных распознавать поверхностный клеточный маркер CD34. Фракция индуцированных антигеном поликлональных антител может быть выделена в высокоочищенной форме. Полученные антитела распознают белковые антигенные детерминанты антигена CD34 и могут быть использованы в методах иммуноцитохимии и проточной цитометрии для детектирования CD34⁺ клеток. Кроме фенотипирования целевых субпопуляций клеток, полученные поликлональные антитела потенциально могут быть использованы при разработке систем обогащения и сепарации CD34⁺ клеток, альтернативных коммерческим, из таких источников, как костный мозг, периферическая и пуповинная кровь.

*Iu.S. Nikolaiev, P.V. Gilchuk,
O.B. Gorbatyuk, A.I. Flyak, A.J. Labyntsev,
D.M. Irodov, D.V. Kolibo, V.A. Kordium*

POLYCLONAL ANTIBODIES AGAINST HUMAN CELL-SURFACE ANTIGEN CD34

An efficient and inexpensive laboratory approach for the generation and the purification of polyclonal antibodies to human antigen CD34 was developed. It was shown that cloned refolded and purified from *Escherichia coli* recombinant extracellular fragment of CD34 antigen retained immunogenic determinants of cell-surface expressed CD34. Immunization of mice with unglycosylated truncated recombinant protein elicit polyclonal antibodies specific for the native human antigen CD34. The

antibodies generated are applicable for phenotyping of CD34⁺ cells using immunocytochemistry and flow cytometry assays.

*Ю.С. Николаев, П.В. Гильчук,
О.Б. Горбатьюк, А.И. Фляк, А.Ю. Лабинцев,
Д.М. Иродов, Д.В. Колибо, В.А. Кордюм*

ПОЛІКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА ПРОТИ ПОВЕРХНЕВОГО КЛІТИННОГО МАРКЕРА CD34 ЛЮДИНИ

Розроблено високоефективний та недорогий лабораторний спосіб одержання та очищення поліклональних антитіл проти поверхневого клітинного маркера CD34 людини. Показано, що клонований в клітині *E. coli* негликозилюваний рекомбінантний білок, що містить зовнішньоклітинний фрагмент антигена CD34 людини, при виділенні з бактерій зберігає необхідні антигенні детермінанти та при імунізації індукує продукування специфічних поліклональних антитіл, що здатні розпізнавати нативний антиген на поверхні клітин. Одержані антитіла можуть бути використані для фенотипування CD34⁺ клітин методами імуноцитохімії та проточної цитометрії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Lanza F., Healy L., Sutherland D.R. Structural and functional features of the CD34 antigen: an update // *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* – 2001. – **15**(1). – P. 1–13.
2. Baech J., Johnsen H.E. Technical aspects and clinical impact of hematopoietic progenitor subset quantification // *Stem Cells.* – 2000. – **18**(2). – P. 76–86.
3. Civin C.I., Strauss L.C., Brovall C., Fackler M.J., Schwartz J.F., Shaper J.H. Antigenic analysis of hematopoiesis. 3. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells // *J. Immunol.* – 1984. – **133**(1). – P. 157–165.
4. Izawa K., Tani K., Nakazaki Y. Hematopoietic activity of common marmoset CD34 cells isolated by a novel monoclonal antibody MA24 // *Exp. Hematol.* – 2004. – **32**(9). – P. 843–851.
5. Krause D.S., Ito T., Fackler M.J., Smith O.M., Collector M.I., Sharkis S.J., May W.S. Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells // *Blood.* – 1994. – **84**(3). – P. 691–701.
6. Porada C.D., Harrison-Findik D.D., Sanada C., Valiente V., Thain D., Simmons P.J., Almeida-Porada G., Zanjani E.D. Development and characterization of a novel CD34 monoclonal antibody that identifies sheep hematopoietic stem/progenitor cells // *Exp. Hematol.* – 2008. – **36**(12). – P. 1739–1749.
7. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* – Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 1989. – V. 1.

8. Furley A.J., Reeves B.R., Mizutani S., Altass L.J., Watt S.M., Jacob M.C., van den Elsen P., Terhorst C., Greaves M.F. Divergent molecular phenotypes of KG1 and KG1a myeloid cell lines // *Blood*. – 1986. – **68**(5). – P. 1101–1107.
9. Studier F.W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures // *Protein Exp. Purif.* – 2005. – **41**(1). – P. 207–234.
10. Горбатюк О.Б., Николаев Ю.С., Иродов Д.М., Дубей І.Я., Гильчук П.В. Ренатурація химерного білка ScFv-CBD з тілець включення *Escherichia coli* // *Біополімери і клітина*. – 2008. – **24**, № 1. – С. 51–59.
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – **227**(5259). – P. 680–685.
12. Kane J.F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli* // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 1995. – **6**(5). – P. 494–500.
13. Гильчук П.В., Окунев О.В., Иродов Д.М., Павлова М.В. Суперпродукция одноцепочечных антител к IFN- α 2b человека в *Escherichia coli* и выделение их в биологически активной форме // *Укр. биохим. журн.* – 2006. – **78**, № 1. – С. 163–171.
14. Kurucz I., Titus J.A., Jost C.R., Segal D.M. Correct disulfide pairing and efficient refolding of detergent-solubilized single-chain Fv proteins from bacterial inclusion bodies // *Mol. Immunol.* – 1995. – **32**(17–18). – P. 1443–1452.

Поступила 21.04.10