

Міністерство освіти і науки України  
Національний університет «Києво-Могилянська академія»

Факультет природничих наук  
Кафедра біології

**Кваліфікаційна робота**  
освітній ступінь – бакалавр

на тему «**ОТРИМАННЯ ЗЛИТОГО БІЛКА SPA-B-LACTAMASE ТА ЙОГО  
ФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА**»

Виконала: студентка 4-го року навчання  
спеціальність 091 — біологія  
**Хитра Світлана Олександрівна**

Керівники  
Кордюм В. А.,  
член-кореспондент НАН України,  
академік НАМН України, професор

Наваліхіна А.Г.,  
асистент кафедри біології НаУКМА

Рецензент  
Дерябіна О. Г.  
Кандидат біологічних наук, ст.н.співроб.,  
завідувач відділу генних технологій ДУ  
«Інститут генетичної та регенеративної  
медицини НАМН України»

Кваліфікаційну роботу захищено  
з оцінкою \_\_\_\_\_

Секретар ЕК  
Пасічник Т.В.  
«\_\_» червня 20\_\_ року

Київ – 2020

**ЗМІСТ**

ВСТУП.....	4
Перелік умовних скорочень .....	6
<b>РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....</b>	<b>7</b>
1.1. Характеристика біологічних систем для отримання рекомбінантних білків .....	7
1.1.1. Різновиди гетерологічних систем для синтезу білків.....	7
1.1.2. <i>E. coli</i> як система синтезу рекомбінантних білків, переваги та недоліки її застосування.....	11
1.1.3. Експресія генів з використанням векторів серії Pet.....	13
1.1.4. Штами <i>E. coli</i> , що використовуються для клонування та експресії генів. ....	14
1.2. Характеристика білка А <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
1.2.1. Структура та функції білка А.....	16
1.2.2. Характеристика основних методів отримання білка А.....	18
1.2.3 Застосування білка А в імунодіагностиці. ....	19
1.3. Методи детекції маркерних молекул злитих білків на прикладі $\beta$ -лактамази .....	21
<b>РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....</b>	<b>23</b>
2.1. Характеристика об'єкту дослідження .....	23
2.2. Реактиви, матеріали та обладнання .....	23
2.2.1. Реактиви.....	23
2.2.3. Розчини. ....	24
2.2.4 Обладнання .....	25
2.3. Отримання білка SPA-bL.....	25
2.3.1. Індукція синтезу білка.....	25
2.3.2. Перевірка наявності фракції цільового білка. ....	26
2.3.3. Визначення розчинності SPA-bL .....	26
2.3.4. Очищення SPA-bL.....	26
2.3.5. Проведення вестерн-блот аналізу SPA-bL.....	27
2.4 Перевірка активності отриманого білка методом імуноферментного аналізу .....	28
<b>РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ ...</b>	<b>29</b>
3.1 Отримання рекомбінантного білка SPA- $\beta$ L.....	29

3.2 Розробка методики візуалізації наявності активності $\beta$ -лактамази .....	33
3.3 Перевірка активності отриманого очищеного білка.....	35
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ .....	37
ВИСНОВКИ.....	38
ДОДАТКИ.....	39
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	41

## ВСТУП

Білок А – добре розчинний білок з молекулярною масою 42 кДа, виявлений в клітинній стінці *Staphylococcus aureus*, що з високою афінністю зв'язує Fc-область антитіл різних видів. До біологічних відповідей належать активація системи комплементу, реакції гіперчутливості, клітинна цитотоксичність, продукція інтерферону, активація синтезу поліклональних антитіл та мітогенна стимуляція лімфоцитів [1].

З моменту початку застосування генно-інженерних технологій для синтезу білків, застосування терапевтичних та діагностичних білків в якості біофармацевтичних препаратів значно змінилося. Ці білки необхідні людству у великих кількостях і зазвичай не можуть бути отримані із природних джерел [2].

Мічений білок А корисний в непрямому виявленні антигенів, іммобілізованих на твердій основі. Також білок А може бути використаним для опосередкованого виявлення імунокомплексів в імуноаналізах типу «сандвіч». У таких тестах часто застосовують кон'югати на основі білка А та маркерної молекули, наприклад лужної фосфатази.

Більшість імунокон'югатів на основі білка А сконструйована з використанням хімічних методів. Такі стратегії передбачають наявність високоочищених білків у великих кількостях, цільовий продукт може виявитися дуже неоднорідним. Крім того, з'являються додаткові етапи для очищення химерних білків від некон'югованих частин [3].

З застосуванням генно-інженерних технологій можна отримувати злиті білки з діагностичною метою. Правильно підібрані система та вектор експресії дозволяють напрацьовувати функціонально активні білки з високим виходом. Таким чином можна знизити вартість виробництва імунокон'югатів в лабораторних та промислових масштабах [2].

Метою роботи є отримання функціонально активного злитого білка на основі білка А *Staphylococcus aureus* та  $\beta$ -лактамази.

Індикатором її успішної реалізації є виконання наступних завдань:

- 1.індукувати синтез цільового білка в *E. coli* та забезпечити його продукцію у розчинній функціонально активній формі
2. перевірити здатність білка А зв'язувати антитіла у складі злитого білка
3. встановити активність  $\beta$ -лактамази у складі злитого білка

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ІПТГ - Ізопропіл- $\beta$ -D-1-тіогалактопіранозид

ДСН-ПААГ – електрофорез в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію

Senta – хроматогенний субстрат для виявлення  $\beta$ - лактамаз

2YT – поживне середовище для культивування штамів *E. coli* для клонування

ІМАХ – іммобілізаційна метал-афінна хроматографія

ІФА - імуноферментний аналіз

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Характеристика біологічних систем для отримання рекомбінантних білків

**1.1.1. Різновиди гетерологічних систем для синтезу білків.** Продукція білка *in vivo* – складний процес, котрий має передбачати посттрансляційні модифікації білка, необхідні для його стабільності та біологічної активності, такі як: глікозилювання, фосфорилювання та коректний фолдинг. За синтез білка на різних стадіях відповідає велика кількість коферментів та кофакторів. Якщо білок отримують не з його природного середовища, то такий процес називається продукуванням гетерологічного білка, а білок називається гетерологічним. Гетерологічні білки можна розділити на три групи:

- терапевтичні білки, або ті, котрі використовуються для клінічної діагностики;
- білки, що використовуються як реагенти з дослідницькою та навчальною метою;
- промислові білки.

Основними складовими процесу напрацювання гетерологічного білка є ген, або кДНК, що кодує бажаний білок, вектор та біологічна система. При виборі системи експресії орієнтуються на рекомбінантний білок. Зазвичай використовується найменш вимоглива система експресії, котра все ще продукує білок з бажаними якістю та кількістю (табл. 1.1) [4].

Близько 20% біофармацевтичних білків продукується в клітинах дріжджів, 30% - в *Escherichia coli* та 50% - в тваринних культурах клітин клітинах, зокрема в клітинах ссавців та гібридомах [5,6].

Альтернативними *E.coli* бактеріальними системами експресії є *Bacillus subtilis* та *B. megaterium*. Для них характерна секреція білків в культуральне середовище, до складу їхніх клітинної стінки не входять ліпосахариди, недоліком є здатність здійснювати сильний протеоліз [9,10].

Таблиця 1.1

## Властивості різних систем експресії [11,12]

Критерій	Система експресії			
	Бактерії	Дріжджі	Клітини комах, інфікованих бакуловірусами	Клітини ссавців
Вартість/збері гання	Дешеві/-20 °С	Дешеві/-20 °С	Висока	Дорогі/N <sub>2</sub>
Швидкість росту	Швидкий	Швидкий	Повільний	Повільний
Складність росту	Мінімальне поживне середовище	Мінімальне поживне середовище	Складне поживне середовище	Складне поживне середовище
Рівень експресії	Високий	Від низького до високого	Від низького до високого	Від низького до помірного
Місце секреції білка	Периплазма	Поживне середовище	Поживне середовище	Поживне середовище
Ємність	Висока	Висока	Середня	Низька
Ризик контамінації	Наявність ендотоксинів	Низький	Низький	Віруси, пріони, окогенні ДНК
Посттрансляційні модифікації				
Фолдинг білка	Зазвичай потрібен рефолдинг	Може знадобитися рефолдинг	Правильний	Правильний

Продовження таблиці 1.1

Н-зв'язане глікозилування	-	Маноза	Просте, без сіалової кислоти	Складне
О-зв'язане глікозилування	-	+	+	+
Фосфорилування	-	+	+	+
Ацетилювання	-	+	+	+
Ацилювання	-	+	+	+
γ-карбоксилування	-	-	-	+

В бактеріальних господарів не вистачає можливостей для правильного посттрансляційного процесингу білка, в багатьох випадках гетерологічні білки агрегують у вигляді тілець включення всередині бактеріальних клітин, що часто призводить до втрати їх ферментативної активності [5].

Серед мікробних еукаріотичних систем-господарів дріжджі поєднують в собі переваги одноклітинних організмів (легкість генетичних маніпуляцій, швидкий ріст на дешевих поживних середовищах) зі здатністю до процесингу, типовою для еукаріотичних організмів (фолдинг білка, утворення дисульфідних зв'язків та посттрансляційні модифікації без карбоксилування). Починаючи з 1980-х років більшість рекомбінантних білків дріжджів напрацьовували за допомогою *S. cerevisiae* [5,6]. Серед недоліків цього організму неможливість досягати високої щільності клітин, обмежена секреція білків та відмінності у процесах глікозилування [6,13].

Крім *S. cerevisiae* поширеними дріжджевими господарями є *Pichia pastoris* та *Hansenula polymorpha*. Клітини дріжджів не містять ендотоксинів та

пірогенних речовин клітинної стінки, синтезовані білки не накопичуються у вигляді тілець-включень [14].

Для інфікованих бакуловірусом клітин комах характерний високий вихід функціонального білка, такі культури клітин не потребують наявності сироватки в поживному середовищі, що спрощує очистку цільового продукту. Розміри геному бакуловірусів варіюються в межах 80 – 180 т. п. н., що дозволяє вміщати великі вставки. Однак отримання білка з використанням цієї системи дорогартісне та займає багато часу, одним із обмежень є неможливість здійснювати посттрансляційні модифікації великих об'ємів білків [15].

З еукаріотичних клітин тваринного походження як системи експресії найчастіше використовують лінії клітин яєчника китайського хом'яка (CHO), клітини нирки хом'ячати (ВНК) та клітини мієломи миші (NS0). Також застосовують лінії людського походження: клітини ембріональної нирки людини (HEK-293) та клітини отримані з сітківки ока (PER-C6). Причиною популярності клітин ссавців є їхня здатність правильно здійснювати посттрансляційні модифікації, що включають протеолітичну обробку, утворення дисульфідних зв'язків, глікозилювання, с-карбоксілювання, b-гідроксилювання, O-сульфатування та амідування [6]. Однак, у цих ліній є низка вагомих недоліків: клітини не досягають високої щільності, присутній високий ризик контамінації, та необхідні дорогі поживні середовища зі специфічними факторами росту [16, 17].

За допомогою рослинних систем експресії білки можуть бути продуковані в різних цільових тканинах та клітинах, будучи стабільними та невибагливими до умов навколишнього середовища. Терапевтичні білки, отримані з використанням рослин, з меншою ймовірністю будуть контаміновані патогенними мікроорганізмами людини, ніж білки з тваринних ліній. Також рослини можуть здійснювати більшість посттрансляційних модифікацій. Основним лімітувальним фактором цієї системи є низький рівень виходу білка. Білки рослин не мають кінцевих залишків галактози та сілової кислоти, що зазвичай наявні у білків тварин, а натомість мають  $\alpha$ -(1,3)фукозу та  $\beta$ -

(1.2)ксилозу. Ця відмінність пояснює можливу імуногенність рослинних глікопротеїнів [4].

І прокаріотичні, і еукаріотичні системи експресії широко застосовуються. Систему вибирають під певне завдання, оцінюючи її переваги та недоліки, зважаючи на тип, функцію та бажаний вихід гетерологічного білка

**1.1.2. *E. coli* як система синтезу рекомбінантних білків, переваги та недоліки її застосування.** Клітини *E. coli* були першою системою, використаною для синтезу рекомбінантних генів [18]. Хоча наразі існує значна кількість інших продуцентів, *E. coli* досі активно застосовують як систему синтезу гетерологічних білків.

Поширеність застосування системи експресії *E. coli* пояснює ряд ознак, серед яких гарна вивченість організму, швидкий ріст на дешевих поживних середовищах, швидка трансформація, робота з культурою *E. coli* безпечніша для дослідника ніж робота з клітинними лініями ссавців, кінцевий продукт не міститиме вірусів людини, розроблена велика кількість векторів, існує багато штамів продуцентів, що забезпечують напрацювання білка з різними характеристиками [19].

Вектор експресії *E. coli* має ті ж характеристики, що і типовий вектор, наприклад селективний маркер, точку початку реплікації, промотор транскрипції, 5'нетрансльовану область та сайт ініціації трансляції. Критичною особливістю таких векторів є наявність мітки злиття, котра транскрибується разом з цільовим геном. Промотори, 5'UTR, N-кінцеві кодони та мітки злиття найбільше впливають на транскрипцію, вихід білка, його розчинність та очистку.

Однак, *E. coli* не є ідеальною системою експресії для синтезу будь-якого білка, лімітуючим фактором може бути наявність ендотоксинів у складі клітинної стінки, відсутність механізмів глікозилювання, надпродукування гетерологічного білка [20].

Час поділу клітин *E. coli* в середовищах з солями та глюкозою за температури 37°C та постійному перемішуванні становить 20 хв. Це означає, якщо культура інокульована в середовище у розведенні 1/100, то вона досягне

стаціонарної фази за декілька годин. Теоретичний поріг щільності бактерій *E. coli* в рідкому середовищі становить  $1 \times 10^{13}$  живих клітин в 1 мл, однак за типових лабораторних умов (37°C, використання середовища LB), верхньою межею буде  $1 \times 10^{10}$  клітин/мл.

Геном *E. coli* є секвенованим та анотованим, і вся необхідна інформація знаходиться у вільному доступі в сучасних базах даних, метаболізм детально описано [21].

Для високоефективної очистки гетерологічного білка обов'язковою умовою є додавання мітки злиття на N- чи C- кінці. Оптимальна мітка має забезпечувати легке виявлення синтезу, високу продукцію та розчинність білка, легке виділення очищених білків. Для *E. coli* розроблений широкий спектр таких міток. Існує велика кількість векторів, що зумовлюють внутрішньоклітинне напрацювання білка, або їх секрецію в периплазму та культуральне середовище [20].

Перешкодою, з якою найчастіше зустрічаються дослідники при виділенні білка з цитоплазми *E. coli* є можливість утворення нерозчинних тілець включення. В такому вигляді білки щільно упаковані та не проявляють біологічної активності. Отримання функціональних білків з тілець включення здійснюється за рахунок правильного рефолдингу після виділення білка, що потребує великої кількості часу та трудомістких додаткових етапів. Сьогодні певні посттрансляційні модифікації в *E. coli* можна викликати шляхом коекспресії генів відповідних ферментів, однак така спільна експресія впливає на швидкість росту бактерій, а деякі вектори не зможуть бути експресовані в одному штамі.

Не дивлячись на те, що система *E. coli* добре вивчена, проблеми синтезу функціонально активного білка та складних етапів його очистки лишаються невирішеними [22,23].

### 1.1.3. Експресія генів з використанням векторів серії Pet Система pET є найбільш популярною системою для гетерогенної експресії в *E.coli* [24].

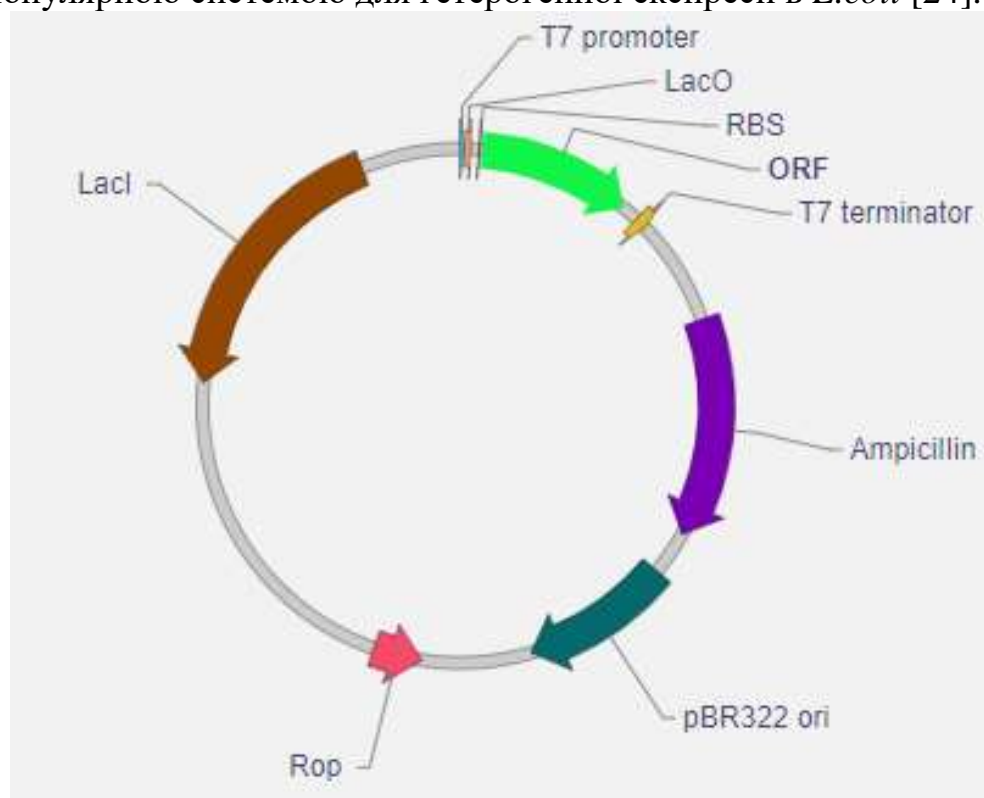


Рис.1.1. Схематична будова pET вектора [24]

Цільовий білок, продукований з використанням такої системи, може представляти 50% загальної кількості білків клітини. Ген інтересу клонується за промотором, що розпізнається РНК полімеразою фагу Т7. Ця високоактивна полімераза знаходиться під контролем *lac UV5* промотора. Таким чином ця система може бути індукована лактозою, або її аналогом, що не піддається гідролізу, ізопропіл- $\beta$ -D-1-тіогалактопіранозидом (ШПТГ). Окрім індукції з використанням ШПТГ, послуговуються протоколом автоіндукції в лабораторних умовах. Хоча система експресії pET розроблена для високого рівня продукування рекомбінантного білка, зменшення кількості ШПТГ інгібує експресію гену інтересу. Така ситуація може бути корисною, коли необхідно напрацювати малорозчинні білки [20,24].

LacI зв'язується з *lac* опероном і він блокується, що дозволяє здійснювати експресію гену РНК полімерази Т7. Базальна експресія може контролюватися *lac I<sup>Q</sup>*, а також коекспресією лізоциму Т7. Лізоцим Т7 зв'язується з РНК полімеразою фагу Т7 та інгібує ініціацію транскрипції з промотора Т7. Таким чином, якщо

невеликі кількості РНК полімерази фагу Т7 утворюються через несильну експресію її гену, лізоцим Т7 буде ефективно контролювати ненавмисну експресію гетерологічних генів, що знаходяться під контролем промотора Т7. Лізоцим Т7 забезпечується сумісною плазмідною (pLysS або pLysE). Після індукції кількість продукованої РНК полімерази фагу Т7 перевищує рівень полімерази, який може інгібувати лізоцим. Залишок РНК полімерази може брати участь в транскрипції рекомбінантного гену. Ще один рівень контролю полягає у введенні оперона *lacO* після промотора Т7 [24].

**1.1.4. Штами *E. coli*, що використовуються для клонування та експресії генів.** Найбільш відомим промисловим штамом для біосинтезу рекомбінантних білків є штам *E. coli* BL21 та його похідні (Таблиця 1.2) [25,26]. В клітинах BL21 спостерігається дефіцит протеази Lon, котра руйнує велику кількість чужорідних білків. Ще одним геном, що відсутній у геномі BL21 є ген, що кодує протеазу OmpT зовнішньої мембрани, функція якої заключається в деструкції позаклітинних білків, амінокислоти на які розпадаються білки, потім поглинаються клітиною. Це може бути проблемою при напрацюванні рекомбінантного білка, бо після лізису клітин, протеаза OmpT може його розщеплювати. Штам BL21 (DE3) містить хромосомну копію гена РНК полімерази Т7 і зазвичай використовується у поєднанні з системою рЕТ [27].

Відомими похідними від штаму BL21 є штами BL21-CodonPlus (DE3) та Rosetta. Дані штами використовують для напрацювання еукаріотичних білків, мРНК яких містить кодони, які рідко зустрічаються в клітинах *E. coli*. Штам BL21 (DE3) pLysS містить плазмиду pLysS, що несе ген, що кодує лізоцим Т7; цей штам використовується для продукування токсичних для продуцента білків.

Для отримання білків з терапевтичною метою часто використовується лінія К-12. Штам Origami містить мутації як *trxB* (тиредоксинредуктази), так і гена, що кодує глутатіонредуктазу (*gor*), що помітно посилює утворення дисульфідних зв'язків у цитоплазмі. Ще одним штамом лінії К-12 є HMS174, що має мутацію гену *recA*. Ця мутація позитивно впливає на стабільність плазмиди [26].

Похідні штамів BL21 (DE3) можуть засвоювати глюкозну частину дисахариду тільки у присутності лактози, однак першочергово потрібно вводити додаткову глюкозу, бо інакше не відбувається АТФ-зв'язане поглинання лактози. Групою дослідників було показано, що штам HMS174 (DE3) можна культивувати з лактозою в якості єдиного джерела карбону під час індукції [20].

Таблиця 1.2  
Експресійні штами *E.coli* [25]

Штам	Короткий опис	Генотип	Використання
BL21 (DE3)	Основний IPTG-індукувальний штам, що містить РНК полімераза T7	F- <i>ompT lon</i> <i>hsdSB</i> (rB- mB-) <i>gal dcm</i> (DE3)	Загальне напрацювання білка
BL21 (DE3) pLysS	pLysS експресує ген лізоциму T7	F- <i>ompT lon</i> <i>hsdSB</i> (rB- mB-) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (CamR)	Синтез токсичних білків
BL21 (DE3) pLysE	Висока експресія гену лізоциму T7	F- <i>ompT lon</i> <i>hsdSB</i> (rB- mB-) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysE (CamR)	Синтез токсичних білків
BL21 star (DE3)	Відсутня функціональна РНКаз Е	F- <i>ompT lon</i> <i>hsdSB</i> (rB- mB-) <i>gal dcm rne131</i> (DE3)	Загальне напрацювання білка
BL21-A1	РНК полімераза T7 індукується арабінозою	F- <i>ompT lon</i> <i>hsdSB</i> (rB- mB-) <i>gal dcm</i>	Загальне напрацювання білка

		<i>araB::T7RNAP-tetA</i>	
BLR (DE3)	Не синтезується RecA, що зумовлює тривалість напіврозпаду транскрипту	F- <i>ompT lon hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3) (TetR)</i>	Отримання нестабільних білків
HMS174 (DE3)	Не синтезується RecA, підходить для клонування та напрацювання білка	F- <i>recA1 hsdR(rK12-mK12+) (DE3) (RifR)</i>	Отримання нестабільних білків
Origami2 (DE3)	Містить високоактивну тіоредоксинредуктазу та глутатіонредуктазу	F- <i>ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm lacY1 ahpC (DE3) gor522:: Tn10 trxB (KanR, TetR)</i>	Продуктування нерозчинних білків
T7 Express	ПТТГ-індукований	<i>fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10-- TetS)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10-TetS)</i>	Загальне напрацювання білків

## 1.2. Характеристика білка A *Staphylococcus aureus*

**1.2.1. Структура та функції білка A.** Грампозитивні бактерії *Staphylococcus aureus* є збудниками ряду захворювань людини. Пептидоглікан

клітинної стінки цих мікроорганізмів утворюється з попередників ліпиду II, C55-(PO<sub>3</sub>)-2-N-ацетилмурамінової кислоти (MurNAc)-(L-Ala-D-iGln-(Gly5)-L-Lys-D-Ala-DAla)-GlcNAc, за допомогою реакцій транспептидування та трансглікозилювання з отриманням полімеру [MurNAc- (L-Ala-D-iGln- (Gly5) L-Lys-D-Ala)-GlcNAc]<sub>n</sub>. У пептидоглікані закріплені тейхоеві кислоти та білки, які сприяють специфічній взаємодії між мікроорганізмами та тканинами мікроорганізму [28].

Одним із таких поверхневих білків *S. aureus* є білок А. Цей білок є фактором вірулентності із молекулярною масою 40–60 кДа, який складається з 4 або 5 гомологічних імуноглобулін-зв'язуючих доменів (E, D, A, B і C), варіабельної повторювальної ділянки, Xr, та консервативної ділянки, Xc, до якої належить послідовність для прикріплення до клітинної стінки. Білок ковалентно закріплений у клітинній стінці *Staphylococcus aureus* [1, 29, 30].

Кожен з п'яти доменів білка А розташований у трьох антипаралельних  $\alpha$ -спіральных пучках, що складають з 58 амінокислотних залишків. Ця тривимірна структура стабілізується гідрофобним ядром. Домен В білка А здатен взаємодіяти з фрагментом Fab 2A2 антитіла IgM людини. Білок А може зв'язуватися з доменом D, Fab і Fc $\gamma$  ділянками антитіла. Окрім того, цей білок зв'язується з IgG двома різними способами: кожен з п'яти гомологічних імуноглобулін-зв'язуючих доменів зв'язується як з фрагментом Fc, так і фрагментом Fab. Це зв'язування є високоспецифічним, константа афінності взаємодії з Fc-ділянкою -  $10^8$  (M<sup>-1</sup>) [1, 29].

Взаємодія білка А з фрагментом Fc $\gamma$  блокує здатність антитіл до активації Fc- рецептор-опосередкованого опсонофагоцитозу та інгібує процес загибелі мікроорганізмів. З іншого боку, зв'язування білка А з фрагментом Fab VH3-ланцюга IgM призводить до зв'язування рецепторів В-клітин та їх клональної експансії (рис.1.2). Це, у свою чергу, зумовлює апоптоз клітин імунної системи. Таким чином, під час інфікування макроорганізму білком А імунну відповідь порушується. Хоча хвороби, викликані *S. aureus*, переважно проявляються локалізованою інфекцією шкіри або м'яких тканин, її супресивний вплив на імунну систему є загальним [29,31].

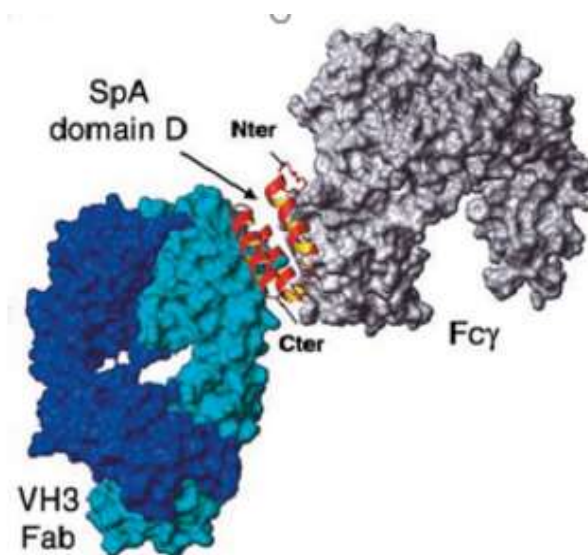


Рис.1.2 Зв'язування Fab VH3 і Fcγ [1]

**1.2.2. Характеристика основних методів отримання білка А.** Білок А отримують з культури *S. aureus* дикого типу, яку піддають подальшому лізису, або з культур мутантних або секреторних штамів, зокрема *S. aureus* A676. У обох випадках очищення білка проводять за допомогою афінної хроматографії з фіксованим IgG [32].

Близько 7% маси клітинної стінки найбільш продуктивного штаму Cowan I складається з SpA, що еквівалентно 1,7% загального вмісту бактеріального білка. Тим не менш, культивувати великі обсяги *S. aureus*, зважаючи на патогенність виду. Саме тому для широкомасштабного виробництва білка А використовують молекулярні методи, завдяки яким можна напрацьовувати білок А у безпечних для дослідників та робітників клітинах *E. coli*. Це допомагає уникнути потреби в більш високих рівнях безпеки, необхідних для роботи зі штамми дикого типу *S. aureus*, що, відповідно, знижує виробничі витрати [1,33].

Після напрацювання білка, клітини лізують, а подальше очищення проводять з використанням методів водно-рідинної афінної хроматографії, іонообмінної та гель-фільтраційної хроматографій та різних ферментативних методів.

Використання методу водно-рідинної афінної хроматографії дозволяє отримати білок зі збереженням бажаної біологічної активності. Для цього

використовують колонку з діоксидом кремнію і градієнтне елюювання водою з ацетонітрилом та ацетатом амонію як добавкою [34].

Гідрофобність білка становить головну проблему при його очищенні. Для цього використовують іонообмінну хроматографію, афінну хроматографію та гель-фільтрацію. Методи іонообмінної хроматографії та гель-фільтрації не здатні забезпечити повноцінне очищення білка, тому такі препарати є непридатними для терапевтичного застосування. А реагенти, необхідні для проведення афінної хроматографії, є дорогими та менше ефективними. [35].

Комерційно доступний білок А продукується як внутрішньоклітинний білок, що очищується після лізису клітин з використанням нікелю, котрий зв'язується з гістидиновими мітками. Використання штамів *E.coli*, що секретують білок, має ряд переваг, оскільки немає потреби у введенні додаткових стадій для екстракції периплазматичних білків та видалення забруднювального бактеріального ендотоксину [36, 37].

В ході афінної хроматографії білок А зв'язується з різними матрицями, такими як: діоксид кремнію, агароза, целюлоза чи зшита декстроза – для отримання гібридних хроматографічних смол, очистки антитіл, білків та пептидів [1,38].

Білок А також може бути іммобілізованим ковалентно на полімерній підложці з використанням ферментативних методів. Одним з найбільш ефективних методів ферментативного прикріплення білків на поверхні є використання транспептидази *S. aureus* – сортази [37].

**1.2.3 Застосування білка А в імунодіагностиці.** Основною властивістю білка А, яка робить його цікавою для використання є можливість зв'язування з Fc-ділянкою усіх, окрім IgG3, антитіл людини та деяких тварин, зокрема свині, собаки, кролика, кози та миші. Білок А застосовується у широкому спектрі біохімічних, біотехнологічних та медичних сфер [1, 28, 30].

Білок А може зв'язуватися з різними полімерними носіями, такими як: агароза, і застосовуватись в імунопреципітації – для очищення антитіл з біологічних розчинів. Білок А використовується в таких методах тестування, як агрегація, імуноферментний аналіз та вестерн-блот. Він також широко

застосовується у фармацевтичних аналізах для зв'язування з імунними комплексами та сироватковими Ig. Білок А використовували і як радіоактивну мітку для визначення антитіл великої рогатої худоби та людини, особливо підкласу IgG2, до *Brucella abortus*, а також при тестуванні на коагулінацію людського антитіла до *Brucella sp.* [1].

SrA можна застосовувати як лікарський засіб при аутоімунних захворюваннях. Білок А безпосередньо зв'язується з моноцитами та В-клітинами, які відіграють основну роль у розвитку різних аутоімунних захворювань. Така взаємодія призводить до кращого контролю над захворюванням, а саме ревматоїдним артритом та ідіопатичній тромбоцитопенічній пурпурі [39].

Типування гена SrA використовується для вивчення спорідненості ізолятів *S. aureus*. Для цього застосовують гель-електрофорез в імпульсному полі (PFGE), типування мультилокусної послідовності (MLST) та різні методи, засновані на поліморфізмі довжини рестрикційних фрагментів. Метод типування SrA зосереджені на варіабельній X ділянці SrA [40, 41].

*S. aureus* є збудником різних захворювань людини, наприклад: бактеріємії, ендокардиту, сепсису та харчових розладів. Тому розробка надійної, швидкої та дешевої методики виявлення цих мікроорганізмів у різних середовищах, а саме: воді, повітрі, їжі та рідині макроорганізму – є критично важливим для контролю інфекційних захворювань.

Розроблено різні підходи до ідентифікації та діагностики *S. aureus*. Традиційний золотий стандарт полягає у характеристиці бактеріальної колонії з використанням селективного середовища. Хоча цей метод є простим та точним, він характеризується значною тривалістю.

Доступними є і молекулярні методи, такі як ПЛР, що дозволяють швидше та точніше виявляти збудника, однак вони потребують дорогого обладнання та реактивів. Зараз SrA застосовується для швидкого, точного та дешевого виявлення *S. aureus* за допомогою ПЛР у реальному часі, імуноферментного аналізу та методів за участі аптамерів [1,42]. При цьому білок А є ідеальним

молекулярним маркером для виявлення *S. aureus*, оскільки його ген дуже консервативний (одна мутація на 70 місяців) [42].

### **1.3. Методи детекції маркерних молекул злитих білків на прикладі $\beta$ -лактамази**

$\beta$ -лактамази – ферменти, що забезпечують стійкість до  $\beta$ -лактамних антибіотиків у грамнегативних бактерій. Це – велика група ферментів, спільною ознакою яких є здатність гідролізувати  $\beta$ -лактамне кільце. Біохімічно їх можна класифікувати на два широкі підрозділи відповідно до механізму, завдяки якому вони здійснюють гідроліз, або шляхом утворення ацильного ферменту з серином активного сайту, або шляхом гідролітичної реакції, що полегшується одним або двома атомами цинку в активних центрах металло- $\beta$ -лактамаз [43].

Сьогодні багато штамів бактерій набувають стійкості до  $\beta$ -лактамних антибіотиків, тому багато дослідників працюють над розробкою простих методів детекції карбапенемаз.

Найпростішими та найдешевшими методами детекції  $\beta$ -лактамаз є колориметричні аналізи, які можуть визначити гідроліз амідних зв'язків  $\beta$ -лактамів відповідно до зміни кольору. В конкретних тестах використовується хромогенний  $\beta$ -лактам (наприклад, нітроцефін), який змінює колір після гідролізу. Неспецифічні тести засновані на неспецифічних взаємодіях з молекулами гідролізованого  $\beta$ -лактаму або на виявленні зміни рН. Добре відомим неспецифічним тестом є аналіз крохмаль-йод. Після гідролізу індикаторного  $\beta$ -лактаму реакційна суміш темно-синього кольору втрачає забарвлення. Для виявлення продуцентів  $\beta$ -лактамази був розроблений метод на основі фенолового червоного. Продукція  $\beta$ -лактамази виявляється при зміні кольору з червоного на жовтий. Застосовуючи тест Carba NP, бактеріальну культуру змішують з лізувальним розчином, безклітинний супернатант змішують з розчином фенолового червоного, сульфату цинку та іміпінему. У бактерій, що продукують карбапанемазу, колір реакційної суміші міняється з червоного на жовтий або світло-червоний.

Виявлення гідролізу карбапанему з використанням спектрофотометру вважається еталонним методом для підтвердження активності карбапенемази. Цей підхід є дуже трудомістким, його не можна регулярно застосовувати в діагностичних лабораторіях. Для визначення активності карбапенемази бактеріальний сирий екстракт, зазвичай отриманий після обробки ультразвуком, додають в розчин карбапанему з буфером, і гідроліз  $\beta$ -лактамного кільця вимірюють в УФ-спектрах [44, 45].

Senta – хромогенний цефалоспорин, що легко гідролізується  $\beta$ -лактамазами всіх класів, крім металлоферменту *Aeromonas hydrophilla* (рис.1.3). Його практично неможливо використовувати для виявлення шиамів, що продукують  $\beta$ -лактамазу, на чашках з щільним поживним середовищем, він корисний для досліджень кінетики та детекції ферментів в неочищених екстрактах та хроматографічних фракціях.

Такі субстрати, гідроліз яких можна безпосередньо контролювати у видимому діапазоні хвиль, являють собою особливий інтерес для кінетичної характеристики  $\beta$ -лактамаз. Наприклад, нітроцефін широко використовується як субстрат-репортер при вивченні інактиації  $\beta$ -лактамаз, дозволяє швидко ідентифікувати активні фракції під час очистки  $\beta$ -лактамази [46].

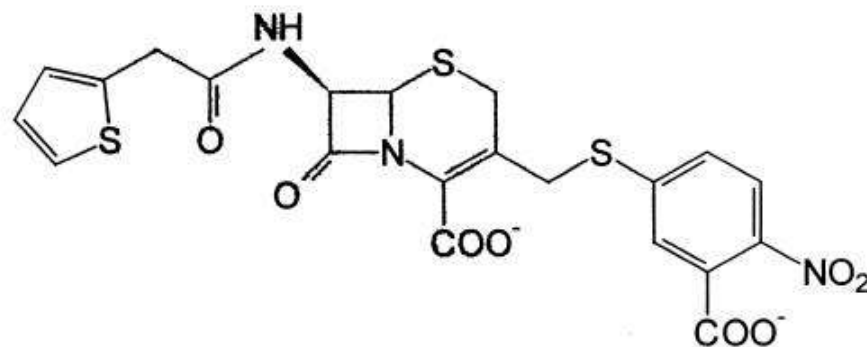


Рис.1.3. Структурна формула Senta [46]

Був розроблений метод для вивчення активності  $\beta$ -лактамази у білкових розчинах та в бактеріальних клітинах, заснований на зміні теплового потоку, отриманого в результаті ферментативного гідролізу  $\beta$ -лактамів з використанням калориметрії ізотермічного титрування [47].

## РОЗДІЛ 2

### ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1. Характеристика об'єкту дослідження

Об'єктом дослідження є білок SPA-bL, що складається з білка А *Staphylococcus aureus* та  $\beta$ -лактамази. Молекулярна маса SPA-bL – 66 кДа. До складу білка входить 591 амінокислота, ізoeлектрична точка – 5.29. Детальна інформація про амінокислотний склад наведена у додатку 1. Плазмиду для отримання біка було отримано шляхом видалення послідовності лужної фосфатази з вектору *pET24-SPA-Apmut* та вставки гену  $\beta$ -лактамази.

#### 2.2. Реактиви, матеріали та обладнання

**2.2.1. Реактиви.** У роботі було використано реактиви: акриламід («Sigma», США), бісакриламід («Sigma», США), тріс (тріс(гідроксиметил)амінометан («Helicon»)), додецилсульфат натрію SDS (SDS – sodium dodecyl sulfate) («Sigma», США), тетраметилетилендіамін (TEMED – tetramethylethylenediamine) («Fermentas», США), персульфат амонію (PSA – ammonium persulfate) («Sigma», США), ізопропіл-D-тіогалактопіранозид (ІПТГ) («Thermo Scientific», США), лізоцим («Fluka», США), крохмаль, йод (I<sub>2</sub>), ампіцилін («Arterium», Україна), імідазол («Sigma», США), канаміцин («Київмедпрепарат», Україна), глюкоза («Фармак», Україна), хлорид натрію (NaCl) («Merck», Німеччина), сульфат амонію ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) («Sigma», США), сульфат магнію (MgSO<sub>4</sub>) («Arterium», Україна), гідрофосфат натрію (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) («Merck», Німеччина), 2-меркаптоетанол (НОСН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>SH) («Roth», Німеччина), гліцерин («Panreac», Іспанія), лактоза («Sigma», США), агароза («Fluka», США), етилендіамінтетраацетат (EDTA) («GE Healthcare», США), Твін-20 («Sigma», США), знежирене сухе молоко («Bio-Rad», США), 5-бром-4-хлор-3'-індоліфосфат п-толуїдин (BCIP-T) («Fermentas», США), нітро-синій хлорид тетразолію (NBT) («Fermentas», США), маркер молекулярних мас PageRuler Plus

Prestained Protein Ladder, 26619 («Thermo Scientific», США), барвник PageBlue Protein Staining Solution («Thermo Scientific», США).

### 2.2.2. Поживні середовища.

1. Середовище 2YT-KG (17 г/л бактотриптон («Fluka», США), 10 г/л дріжджового екстракту («Fluka», США), 5 г/л NaCl), середовище 2YT-KG (17 г/л бактотриптон, 10 г/л дріжджового екстракту, 5 г/л NaCl, 2% глюкози, 50 мг/л канаміцину),
2. середовище 2YT-K для аутоіндукції (2YT, 1/20 від об'єму середовища NPS (0,5 М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 1/50 від об'єму середовища розчину 5052, 1 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 50 мг/л канаміцин.
3. LB-KmG (LB («Amresco», США), 50 мкг/мл канаміцин, 1 % глюкози).

### 2.2.3. Розчини.

PBS (10x): 0,14 М NaCl, 2,7 мМ KCl, 10мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,8 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (рН 7,4),

буферний розчин для приготування проб білків для гель-електрофорезу: 0,3 М тріс-НCl; 25 % гліцерин; 3,5 % додецилсульфат натрію; 0,6 М 2-меркаптоетанол, 0,5 % бромфеноловий синій рН 6,8,

електродний буфер (гліцин 72 г/л, тріс 15 г/л, SDS 5 г/л), фосфатний буфер, буферний розчин для електропереносу білків (5,8 г/л тріс, 2,9 г/л гліцин, 0,37 г/л SDS, 0,2 V метанол),

буферний розчин для блокування неспецифічних місць зв'язування із нітроцелюлозною мембраною (PBS 1x, 3 % сухе молоко)

буферний розчин для фосфатази (100 мМ Tris-НCl (рН=9,5), 140 мМ NaCl, 15 мМ  $\text{MgSO}_4$ ),

розчин 5052 (25% гліцерин, 2,5% глюкоза, 10% лактоза),

розподільний гель 12% (на 7,5 мл гелю 2,4 мл  $\text{H}_2\text{O}$ , акриламід/бісакриламід (1/30) 3 мл, тріс рН 8,8 1,95 мл, SDS 10% 75 мкл, TEMED 5-7 мкл, PSA 10% 75 мкл),

концентрувальний гель 5% (на 7,5 мл гелю 1,4 мл H<sub>2</sub>O, акриламід/бісакриламід (1/30) 0,3 мл, тріс рН 6,8 0,25 мл, SDS 10% 20 мкл, TEMED 3-4 мкл, PSA 10% 20 мкл)

**2.2.4 Обладнання.** Самплери («Eppendorf», Німеччина, 0,5 – 10 мкл, 20 – 200 мкл, 100 – 1000 мкл), центрифуга («Eppendorf», 5424, Німеччина), прилад для проведення гель-електрофорезу («Hoefler» miniVE, США, «Cleaver» OmniPAGE Electrophoresis Systems, Англія), ультразвуковий пристрій, автоматизована хроматографічна система FPLC (fast protein liquid chromatography) («Pharmacia», Швеція), колонка HisTrap HP («GE Healthcare», США) об'ємом 5 мл з сорбентом Ni сефароза High Performance, колонка HiPrep (26/10) («GE Healthcare», США) об'ємом 50 мл з сорбентом сефадекс G-25, полістиролові планшети для ELISA («Nunc», Данія), прилад для напівсухого переносу білків Semi-dry («Helicon»), фотоколориметр (КФК-2), нітроцелюлозна мембрана Hybound-C Extra («GE Healthcare», США)

## 2.3. Отримання білка SPA-bL

**2.3.1. Індукція синтезу білка.** Клітини *E. coli* штаму BL21(DE3), трансформовані плазмідним вектором *pET24-SPA-b-lactamase*, вирощували протягом ночі при 37°C в 2 мл середовища LB-KmG, після чого зливали всю культуральну рідину та додавали свіже середовище LB-KmG [48].

Нарощування культури проводилось на терморегульованій установці за умов інтенсивної аерації до досягнення оптимальної оптичної густини (OD<sub>600</sub>=0,6-1) бактеріальної суспензії, яка була виміряна за допомогою фотоколориметра (КФК-2) [48].

Після досягнення культурою логарифмічної фази росту, інокулювали 1/1000 культури в середовище 2YT-Km для аутоіндукції за 30 °C та 37 °C. Індукцію синтезу білка також здійснювали за допомогою IPTG, що вносили у середовище до кінцевої концентрації 0,5 –1 мМ за 30 °C та 37 °C [48].

**2.3.2. Перевірка наявності фракції цільового білка.** Наявність та кількісний вміст цільового білка в сумарному лізаті клітин-продуцентів визначали методом електрофоретичного розділення білків цитоплазми клітин з використанням денатуруючого SDS – гель-електрофорезу (ДСН-ПААГ) у 12% поліакриламідному гелі. Для приготування зразків клітини осаджували центрифугуванням протягом 4 хв за 4000 об/хв, після чого зливали супернатант та додавали до проб буфер для приготування зразків. Далі проби прогрівали протягом 10 хв, центрифугували за 1000 об/хв з використанням імпульсного режиму 6 – 7 с для розділення супернатанту. Для перевірки наявності на електрофореграмі фракції, чия маса відповідає масі цільового білка, використовували маркер молекулярних мас PageRuler Plus Prestained Protein Ladder. Гель відмивали від бром фенолового синього та SDS прогриваючи у дистильованій  $H_2O$  тричі. Отриманий гель зафарбовували барвником Page blue stain [49].

**2.3.3. Визначення розчинності SPA-bL.** Дізнавалися чи розчинний білок шляхом проведення денатуруючого SDS – гель-електрофорезу (ДСН-ПААГ) у 12% поліакриламідному гелі. Спершу клітини лізували, для цього до осаджених з 20 мл культуральної рідини клітин додавали 20 мл PBS (рН=7,4), 0,5 мМ EDTA, лізоцим (1мг/мл). Після цього суспензію озвучували за допомогою ультразвуку (декілька підходів по 25-30 сек, в перервах 30-40 сек тримали культуру на льоду). Отриманий в результаті лізат центрифугували 10 хв при 13500 g та готували зразки для нанесення на гель. Для цього до 100 мкл супернатанту та осаду зі 100 мкл проби додавали 25 мкл та 50 мкл відповідно буферного розчину для приготування проб білків. Умови проведення гель-електрофорезу аналогічні описаним у розділі 2.3.2 [49].

**2.3.4. Очищення SPA-bL.** Для очистки злитого білка використовували метод іммобілізаційної метал-афінної хроматографії (IMAX). Очищення білка проводили на колонці HisTrap HP об'ємом 5 мл з сорбентом Ni-сефароза High Performance. Колонку під'єднували до автоматизованої хроматографічної системи FPLC [50].

Колонку із сорбентом відмивали від 20% етанолу дистильованою деіонізованою фільтрованою водою (2-5V), врівноважували буфером нанесення PBS (pH 7,4) до встановлення ізолінії самописця і наносили розчинну фракцію білків, котру попередньо відцентрифугували і пропустили крізь мембранний фільтр («Membrane Solutions», США) 0,45 нм. З метою відсортування нецільових білків колонку промивали буфером PBS з 10 мМ імідазолу до встановлення ізоліній [50].

Білок елюювали з колонки PBS із 300 мМ імідазолом.

Гомогенність очищеного білка аналізували у 12% ДСН-ПААГ.

Далі проводили заміну буфера для елюції на такий, що не містив імідазол. Використовували метод гель-фільтрації із використанням сорбенту сефадекс G-25. На врівноважену буфероним розчином PBS гельфільтраційну колонку HiPrep Desalting (26/10) об'ємом 50 мл наносили білок елюований 300 мМ імідазолом [50].

Гомогенність очищеного білка аналізували у 12%-му ДСН-ПААГ. Концентрацію білка визначали за відомою величиною адсорбції  $A_{280}$ , яку розраховували для даної послідовності із застосуванням програми Vector NTI [50].

**2.3.5. Проведення вестерн-блот аналізу SPA-bL.** Для перевірки специфічності білка А використовували вестерн-блот аналіз. Очищений білок розганяли у 12% ДСН-ПААГ. Вирізали потрібну ділянку гелю, вимірювали площу її поверхні. Занурювали гель у свіжоприготований буфер для електропереносу. Анодну та катодну пластини приладу для напівсухого переносу білків Semi-dry («Helicon») промивали дистильованою водою. Змочували буфером для електропереносу ділянку аноду. Збирали із декількох шарів «сендвіч» для електропереносу (3 шари фільтрувального паперу, нітроцелюозна мембрана, гель після розділення у ньому білків, 3 шари фільтрувального паперу, кожна складова змочена у буфері для ЕП) і накривали катодом. Силу струму розраховували за формулою  $S \text{ (см}^2\text{)} \times 0,8 \text{ мА}$ . Перенос здійснювали 2 годин, напруга не перевищувала 50 V. Виймали мембрану, відмивали у PBS, і залишали на ніч при  $+4^\circ\text{C}$  у розчині PBS із 3% сухим молоком.

Відмивали мембрану у PBS, і 1 год при +37°C витримували у розчині поліклональних IgG, кон'югованих з фосфатазою, у PBS, 0,1 % твін 20. Мембрану відмивали тричі у PBS із 0,1 % твін 20, 2 рази ddH<sub>2</sub>O, і залишали у буфері для фосфатази. Для визначення наявності активності фосфатази у складі кон'югату з IgG, готували нерозчинний субстрат BCIP-T з NBT (1 мл буфера для фосфатази, 3,3 мкл BCIP-T, 4,4 мкл NBT). На мембрану наносили субстрат, очікувані полоси візуалізовувалися у фіолетовому забарвленні [51].

#### **2.4 Перевірка активності отриманого білка методом імуноферментного аналізу**

В лунки полістиролового планшета для ІФА вносили поліклональні IgG миші, для блокування місць неспецифічного зв'язування у лунки вносили 0,1% Твін 20. Другим шаром наносили очищений білок SPA-bL. Вносили очищений злитий білок, витримували 1 год, відмивали. Проявляли розчином, що містив ампіцилін та комплекс крохмаль/I<sub>2</sub>. Як контроль замість SPA-bL вносили IFNa2b.

Для виготовлення розчину проявки варили розчин крохмалю концентрацією 12,5 мг/мл. I<sub>2</sub> розводили до  $3,125 \cdot 10^{-4}$  н. Зварений крохмаль та розведений йод змішували у пропорції 1:1. До 50 мкл отриманого розчину додавали 50 мкл Amp, розведеного у фосфатному буфері у концентрації 11,7 мкг/мл.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1 Отримання рекомбінантного білка SPA-βL

Першим етапом роботи було отримання білка SPA-βL в *E. coli* штаму BL21(DE3). Вектор експресії був створений на основі плазмідного вектора pET-24. В ньому ген РНК-полімерази фага T7 знаходиться під контролем лактозного оперону, тому індукція експресії може ініціюватись IPTG. Також, була проведена індукція за протоколом аутоіндукції [52], який передбачає використання неорганічних солей, гліцеролу, глюкози, а також лактози – індуктора експресії. Протокол аутоіндукції, на відміну від більш дорогого способу індукції IPTG, вимагає менших об'ємів культуральних середовищ. Пролонгований час культивування (до 24 годин) дозволяє отримувати максимальні виходи рекомбінантного білка.

Культура *E. coli* з плазмідною *pET24(SPA-β-lactamase)* нарощувалася на середовищі 2YT-KG. Було поставлено чотири варіанти індукції. Індукція IPTG за 30°C та 37°C, та за протоколом аутоіндукції, теж за двох температурних режимів, при 30°C та 37°C. За результатами електрофоретичного розділення (рис. 3.1) було встановлено, що за 30°C з IPTG індукція не проходила. В той час, як за умов аутоіндукції обидві температури у досліді підходять для синтезу білка культурою. Значення оптичної щільності OD<sub>600</sub> для культури при аутоіндукції за 30°C становило 17,2. OD<sub>600</sub> для культури при аутоіндукції за 37°C – 22,7. Отже, вищий вихід білка отримано при застосуванні протоколу аутоіндукції за 37 °C. Отриманий результат збігається з літературними даними щодо *E. coli*. Вихід цільового білка становить 560 мг/л культури.

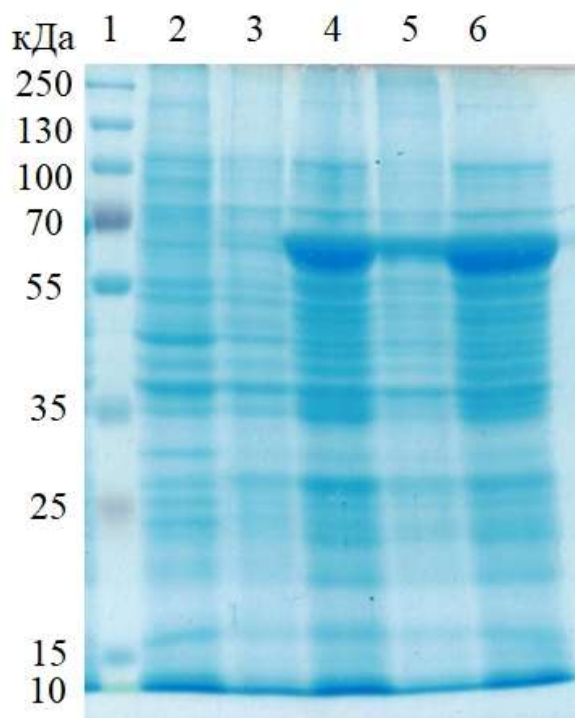


Рис. 3.1. Електрофореграма розділення білків *E. coli*, отриманих в результаті індукування синтезу SPA-βL: 1 – білки-маркери молекулярної маси («Thermo Scientific», США); 2 – клітини без індукції, 3, 5 – індукція ІПТГ при 30°C і 37°C, відповідно; 4, 6 – аутоіндукція при 30°C і 37°C, відповідно.

Для визначення локалізації цільового білка проводили аналіз розчинної та нерозчинної фракції білків цитоплазми. Було показано, що цільовий білок знаходиться у розчинній фракції (рис. 3.2). Отже, білок не потребує етапу ренатурації з нерозчинних тілець включення, і можна очікувати, що він матиме свою нативну конформацію і виявиться активним.

SPA-βL містить генно-інженерно введenu послідовність олігогістидину (6His-tag) на С-кінці білка, тому привабливим було застосування для його очищення методу іммобілізуючої металоафінної хроматографії. Фракцію розчинних білків іммобілізували на сорбенті Ni-сефароза, відмивали від неспецифічно зв'язаних білків. Елюцію очищеного SPA-βL проводили буферним розчином, що містив імідазол (рис 3.3, А). Було встановлено, що за наявності 10 мМ імідазолу білок не сідає на колонку, тому буфер нанесення не має містити імідазол. Задля уникнення втрат цільового білка під час промивки, використовували буфер з концентрацією імідазолу 10 мМ.

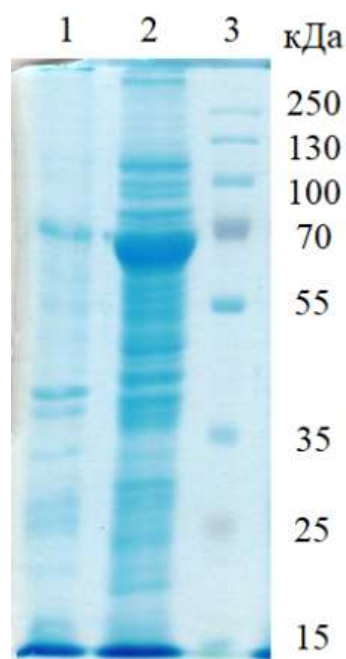


Рис. 3.2. Електрофореграма фракцій білків *E. coli*, отриманих в результаті аутоіндукції синтезу SPA- $\beta$ L: 1 – білки нерозчинної фракції, 2 – білки розчинної фракції, 3 – білки-маркери молекулярної маси («Thermo Scientific», США)

Було встановлено (розділ 3.2), що імідазол впливає на активність білка, тому, необхідною умовою для подальших досліджень було проведення очищення білка. Заміну буфера для елюції на такий, що не містив імідазол, проводили за допомогою гель-фільтрації на сорбенті сефадекс G-25 (рис 3.3, Б). Елюат зберігали при +4°C. В результаті цільовий білок отримано в розчинному вигляді з чистотою близько 90%. Гомогенність очищеного білка аналізували у 12%-му ДСН-ПААГ. Концентрацію білка визначали за відомою величиною адсорбції A280, яку розраховували для даної послідовності із застосуванням програми Vector NTI (додаток 1). Після гель-фільтраційної колонки було отримано білок з концентрацією 150 мкг/мл.

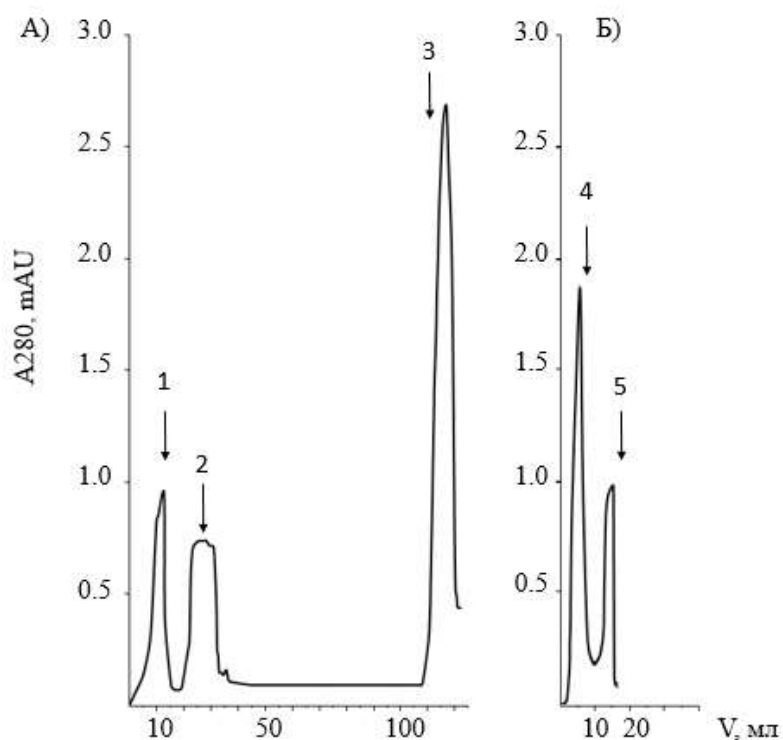


Рис. 3.3. Хроматограма очищення SPA- $\beta$ L на Ni-NTA IDA Chelating Sepharose (A) та на сорбенті сефадекс G-25 (Б): 1 – білки, які не зв’язалися із сорбентом після нанесення білків розчинної фракції на колонку; 2 – неспецифічно зв’язані білки, які видаляються при промиванні сорбенту 10 мМ імідазолом; 3 – SPA- $\beta$ L отриманий елюцією 300 мМ імідазолом; 4 – SPA- $\beta$ L в буфері PBS, без імідазолу, отриманий після гельфільтрації; 5 – імідазол після гельфільтрації.

Після отримання очищеного білка було проведено вестерн-блот аналіз (рис 3.4). Як негативний контроль використовували лактамазу та інтерферон  $\alpha 2\beta$ . На мембрані з перенесеними білками місця неспецифічного зв’язування блокувалися 3% молоком. На мембрану наносили поліклональні IgG, кон’югованих з фосфатазою. Після промивок проявляли із використанням субстрату BCIP-T/NBT. Фосфатаза працювала лише у складі імунного комплексу SPA- $\beta$ L – IgG-AP. Що підтверджує специфічність SPA-складової білка, внаслідок його здатності зв’язувати IgG.



Рис. 3.4. Імуноблот очищеного білка SPA- $\beta$ L: 1 – негативний контроль лактамаза, 2 – негативний контроль інтерферон  $\alpha$ 2 $\beta$ , 3 – білки-маркери молекулярної маси, 4, 5 – 0,5 і 2 мкг очищеного SPA- $\beta$ L, відповідно. Візуалізацію проводили із застосуванням поліклональних антитіл з фосфатазою IgG-AP.

### 3.2 Розробка методики візуалізації наявності активності $\beta$ -лактамози

Серед методів, що дозволяють визначити присутність  $\beta$ -лактамаз, відомим є йодометричний хімічний метод детектування ферментативного гідролізу  $\beta$ -лактамного кільця. Він базується на знебарвленні комплексу, утвореного крохмалем з йодом. Кінцеві продуктами гіролізу, що створюються  $\beta$ -лактамазами, виступають як відновники для йоду у складі комплексу, і спричинюють знебарвлення.

Відомими є методики, де активність  $\beta$ -лактамаз визначали за кількістю йоду, потрібного, щоб окислити продукт утворений ферментом (у випадку пеніциліну це пеніцилінова кислота). Зміну концентрації йоду визначали за допомогою зворотного титрування з тіосульфатом, або спектрофотометрично при довжині хвилі 620 нм встановлювали максимум поглинання комплексу крохмаль/йод.

Швидкий метод виявлення  $\beta$ -лактамазної активності, розроблений Сиволодським Е.П., полягав у тому, що на фільтрувальний папір з 2% розчином

крохмалю наносили культуру мікроорганізмів, на поверхню утвореної бляшки наносили йодний розчин пеніциліну, і за зоною просвітлення синього фону навколо культури встановлювали наявність активності фермента.

Для встановлення наявності лактамази при використанні рекомбінантного SPA-βL було проведено адаптацію даних методик для проведення проявки в ELISA.

При підборі концентрацій крохмалю і йоду враховували інтенсивність забарвлення, утвореного комплексом. До крохмалю, завареного у воді у концентрації 12,5 мг/мл, додавали різні розведення розчину 0,01н I<sub>2</sub> із 4 % KI. Встановили, що оптимальним розведенням йодного розчину було 32-кратне. Необхідно було вирішити проблему зникнення забарвлення приготованої суміші крохмаль/I<sub>2</sub> із ампіциліном. Свіжоприготований розчин ампіциліну з концентрацією 3 mg/ml розводили у фосфатному буфері (pH=6,8). Було показано, за підбраної концентрації розчину ампіциліну, 11,7 мкг/мл (розведення у 256 р.), забарвлення змішаних у співвідношенні 1:1 розчинів крохмаль/I<sub>2</sub> та ампіциліну залишалось стійким впродовж двох діб. Якщо такий розчин вноситься до лунки, у якій присутня лактамаза, то він знебарвлюється, адже лактамаза розрізає лактамне кільце в ампіциліні, і відбувається адсорбція йоду з комплексу крохмаль/I<sub>2</sub>.

В ході проведених досліджень встановили, що на забарвлення розчину для проявки не впливає буфер PBS.

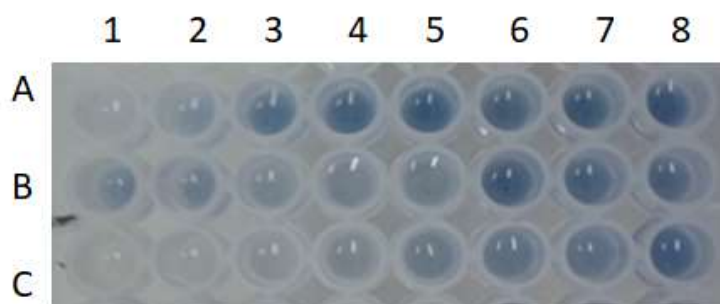


Рис. 3.5. Забарвлення розчину для проявки через 30 хв після внесення до зразків. А – розведення імідазолу, В – проби зразків з та без лактамази, С – розведення середовища культивування LB

Було показано, що сполука включення, утворена в результаті взаємодії йоду з крохмалем, може знебарвлюватися при взаємодії з імідазолом в концентрації 75 мМ і більше. Щоб достовірно детектувати наявну активність  $\beta$ -лактамази, концентрація імідазолу в досліджуваному зразку має становити не більше 20 мМ.

Також на знебарвлення комплексу йод-крохмаль впливає середовище культивування *E. coli* LB (Luria-Bertani medium). При розведенні зразка LB в 1024 рази сполука включення зберігає своє забарвлення.

### 3.3 Перевірка активності отриманого очищеного білка

Встановлення наявності функціональної активності отриманого очищеного білка проводили якісно методом ELISA. В лунки вносили IgG миші, для блокування місць неспецифічного зв'язування у лунки вносили 0,1% Твін 20. Другим шаром наносили очищений білок SPA- $\beta$ L. Проявляли розчином, що містив ампіцилін та комплекс крохмаль/ $I_2$ . Як контроль замість SPA- $\beta$ L вносили IFN $\alpha$ 2 $\beta$ . Функціональну активність SPA у складі SPA- $\beta$ L підтверджено за допомогою етапу зв'язування SPA із шаром імуноглобулінів. В свою чергу  $\beta$ -лактамаза злитого білка змінювала колір комплексу  $I_2$ -крохмаль, гідролізуючи  $\beta$ -лактамне кільце ампіциліна (рис. 3.6). Отримані результати свідчать про наявність активності рекомбінантного злитого SPA- $\beta$ L.



Рис. 3.6. Процес знебарвлення комплексу крохмаль/ $I_2$  одразу після постановки ELISA. Очищений білок SPA- $\beta$ L з концентрацією 10 мкг/мл вносили до розтитрованих IgG миші (15,6 мкг, 3,9 мкг, 975 нг, 244 нг, 61 нг, 15 нг, 4 нг).

Подальше дослідження буде проведено для оптимізації кількісного дослідження активності лактамази у складі SPA- $\beta$ L із використанням такого

субстрату, як CENTA. CENTA є синтетичним субстратом на основі антибіотика з групи цефалоспоринів – цефалотина. При гідролізі субстрату  $\beta$ -лактамазами утворюється кольоровий продукт із піком поглинання при довжині хвилі 405 нм. Як субстрати використовують також ампіцилін та меропенем [53].

## УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Для напрацювання білка з клітинами штаму *E.coli* BL21(DE3) трансформованими плазмідною *pET24(SPA- $\beta$ -lactamase)* проводили аутоіндукцію та індукцію з використанням IPTG. Найвищий вихід білка SPA- $\beta$ L можна отримати за аутоіндукції при 37 °C.

Цільовий білок синтезується в розчинну фракцію, що дозволяє відкинути етап ренатурації з нерозчинних тілець включень.

Фракцію розчинних білків іммобілізували на сорбенті Ni-сефароза, відмивали від неспецифічно зв'язаних білків. Перевірено, що імідазол впливає на активність білка очищення білка SPA- $\beta$ L, тому його подальшу очистку проводили на сорбенті сефадекс G-25. Таким чином вдається отримати цільовий білок чистотою до 90% та концентрацією 150 мкг/мл.

За допомогою вестерн-блот аналізу переконалися в специфічності дії SPA у складі злитого білка.

Для візуалізації активності  $\beta$ -лактамази було підібране оптимальне 32-кратне співвідношення розведення йодного розчину. Стабільний розчин комплексу крохмаль/I<sub>2</sub> та ампіциліну втрачає забарвлення при контакті з виділеним білком.

Використовуючи метод ELISA перевірили функціональну активність отриманого очищеного білка.

Методи, використані у роботі не дають можливості отримати кількісні показники, тому подальша робота має бути напрямлена на підбір оптимального синтетичного субстрату.

## ВИСНОВКИ

Виділено та очищено злитий функціонально активний білок SPA-βL в розчинному вигляді з чистотою близько 90%. Концентрація цільового продукту 150 мкг/мл.

SPA-складова білка специфічно зв'язується з IgG.

Підібрано концентрації розчинів для здійснення проявки β-лактамази у складі SPA-βL.

## ДОДАТКИ

Додаток 1.

## Результати аналізу програмою VectorNTI амінокислотної послідовності SPA-βL

Analysis	Entire Protein
Length	591 aa
Molecular Weight	66001.30
1 microgram =	15.151 pMoles
Molar Extinction coefficient	34640
1 A[280] corr. to	1.91 mg/ml
A[280] of 1 mg/ml	0.52 AU
Isoelectric Point	5.29
Charge at pH 7	-19.75

Amino Acid(s)	Number count	% by weight	% by frequency
Charged (RKHYCDE)	171	33.44	28.93
Acidic (DE)	82	15.08	13.87
Basic (KR)	61	12.51	10.32
Polar (NCQSTY)	161	27.43	27.24
Hydrophobic (AIFWV)	200	31.93	33.84
A Ala	62	7.21	10.49
C Cys	3	0.47	0.51
D Asp	36	6.25	6.09
E Glu	46	8.83	7.78
F Phe	24	5.17	4.06
G Gly	28	2.74	4.74
H His	16	3.24	2.71
I Ile	28	4.79	4.74
K Lys	37	7.06	6.26
L Leu	63	10.78	10.66
M Met	13	2.53	2.20
N Asn	48	8.28	8.12
P Pro	29	4.36	4.91
Q Gln	43	8.20	7.28
R Arg	24	5.46	4.06
S Ser	36	4.94	6.09
T Thr	22	3.42	3.72
V Val	19	2.90	3.21
W Trp	4	1.07	0.68
Y Tyr	9	2.13	1.52
B Asx	84	14.53	14.21
Z Glx	89	17.03	15.06
X Xxx	0	0.00	0.00

Genetic code used: Standard

Amino Acid(s)	Codon(s) Used
*	TGA(1)
A Ala	GCA(16), GCC(10), GCG(9), GCT(27)
C Cys	TGC(2), TGT(1)

D Asp	GAC(12), GAT(24)
E Glu	GAA(35), GAG(11)
F Phe	TTC(13), TTT(11)
G Gly	GGA(4), GGC(5), GGG(5), GGT(14)
H His	CAC(10), CAT(6)
I Ile	ATA(5), ATC(13), ATT(10)
K Lys	AAA(29), AAG(8)
L Leu	CTA(8), CTC(3), CTG(8), CTT(14), TTA(22), TTG(8)
M Met	ATG(13)
N Asn	AAC(30), AAT(18)
P Pro	CCA(13), CCC(3), CCG(5), CCT(8)
Q Gln	CAA(39), CAG(4)
R Arg	AGA(2), CGA(2), CGC(11), CGG(1), CGT(8),
S Ser	AGC(13), AGT(9), TCA(4), TCC(3), TCG(1), TCT(6)
T Thr	ACA(4), ACC(3), ACG(7), ACT(8)
V Val	GTA(6), GTC(3), GTG(3), GTT(7)
W Trp	TGG(4)
Y Tyr	TAC(3), TAT(6)

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Rigi G, Ghaedmohammadi S, Ahmadian G. A comprehensive review on staphylococcal protein A (SpA): Its production and applications. *Biotechnol Appl Biochem.* 2019;66(3):454–64.
2. Malik A. Protein fusion tags for efficient expression and purification of recombinant proteins in the periplasmic space of *E. coli*. *3 Biotech.* 2016;6(1):44.
3. Taizo. Hara Noncompetitive immunoassay of thyroxine using a liquid-phase binding assay *Analytical Chemistry* 1994 66 (3), 351-354 DOI: 10.1021/ac00075a007
4. Desai PN, Shrivastava N, Padh H. Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression. *Biotechnol Adv [Internet].* 2010;28(4):427–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.005>
5. Balbás P, Lorence A. *Recombinant Gene Expression Third Edition.* 2004;824:329–47. Available from: <http://link.springer.com/10.1385/1592597742%5Cpapers3://publication/doi/10.1385/1592597742>
6. Berlec A, Štrukelj B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2013;40(3–4):257–74.
9. Biedendieck R. A *Bacillus megaterium* System for the Production of Recombinant Proteins and Protein Complexes. *Adv Exp Med Biol.* 2016;896:97-113.
10. Cui W, Han L, Suo F, Liu Z, Zhou L, Zhou Z. Exploitation of *Bacillus subtilis* as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond. *World J Microbiol Biotechnol.* 2018;34(10):145.
11. Fernandez JM, Hoeffler JP. *Gene Expression Systems, Using Nature for the Art of Expression.* 1999.
12. Fischer, Rainer & Emans, Neil. (2000). Fischer, R. & Emans, N. Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res.* 9, 279-299. *Transgenic research.* 9. 279-99; discussion 277. 10.1023/A:1008975123362.
13. 6. Vieira Gomes A, Souza Carmo T, Silva Carvalho L, Mendonça Bahia F, Parachin N. Comparison of Yeasts as Hosts for Recombinant Protein Production. *Microorganisms.* 2018;6(2):38.

14. Mattanovich D, Branduardi P, Dato L, Gasser B, Sauer M, Porro D. Recombinant protein production in yeasts. *Methods Mol Biol.* 2012;824:329-358. Doi:10.1007/978-1-61779-433-9\_17
15. Lemaitre, R.P., Bogdanova, A., Borgonovo, B. Et al. Flexiβac: a versatile, open-source βaculovirus vector system for protein expression, secretion, and proteolytic processing. *BMC Biotechnol* 19, 20 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0512-z>
16. Kim JY, Kim YG, Lee GM. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: Current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;93(3):917–30.
17. Zhu J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2012;30(5):1158–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.022>
18. Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB. Construction of βiologically functional βacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1973;70(11):3240-4.
19. Gupta SK, Shukla P. Microβial platform technology for recombinant antibody fragment production: A review. *Crit Rev Microbiol.* 2017;43(1):31-42. Doi:10.3109/1040841X.2016.1150959
20. Jia B, Jeon CO. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biol.* 2016;6(8)
21. SEZONOV G., JOSELEAU-PETIT D, D'ARI R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani βroth. *J. Bacteriol.* 189 8746–8749 10.1128/JB.01368-07
22. Basu A. Refolding of proteins from inclusion βodies: rational design and recipes /Basu A, Li X, Leong S.S // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – Vol.92, №5. – P.241-51.
23. Slouka C, Kopp J, Spadiut O, Herwig C. Perspectives of inclusion βodies for βio-βased products: curse or βlessing?. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103(3):1143-1153. Doi:10.1007/s00253-018-9569-1
24. <https://en.vectorbuilder.com/learning-center/vector-system/pet16β.html>

25. <https://blog.addgene.org/plasmids-101-e-coli-strains-for-protein-expression>
26. Hausjell J, Weissensteiner J, Molitor C, Halßwirth H, Spadiut O. E. Coli HMS174(DE3) is a sustainable alternative to BL21(DE3). *Microb Cell Fact.* 2018;17(1):169.
27. JOSEPH BC, PICHAIMUTHU S, SRIMEENAKSHI S, MURTHY M, SELVAKUMAR K, GANESAN M, MANJUNATH SR. 2015. An overview of the parameters for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Cell Sci. Ther.* 6, 5 (10.4172/2157-7013.1000221).
28. Becker S, Frankel MB, Schneewind O, Missiakas D. Release of protein A from the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(4):1574–9.
29. Hoßer S, Nord K, Linhult M. Protein A chromatography for antibody purification. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2007;848(1):40–7.
30. Pauli NT, Kim HK, Falugi F, Huang M, Dulac J, Dunand CH, et al. *Staphylococcus aureus* infection induces protein A-mediated immune evasion in humans. *J Exp Med.* 2014;211(12):2331–9.
31. Keun Kim H, Falugi F, Missiakas DM, Schneewind O. Peptidoglycan-linked protein A promotes T cell-dependent antibody expansion during *Staphylococcus aureus* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(20):5718–23.
32. Shukla AA, Hußbard B, Tressel T, Guhan S, Low D. Downstream processing of monoclonal antibodies--application of platform approaches. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;848(1):28-39.
33. Graille M, Stura EA, Corper AL, et al. 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. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(10):5399-404.
34. Aßoul-Enein, H.Y., Rigi, G., Farhadpour, M. et al. Per Aqueous Liquid Chromatography (PALC) as a Simple Method for Native Separation of Protein A. *Chromatographia* 80, 1633–1639 (2017). <https://doi.org/10.1007/s10337-017-3412-1>

35. Yeon, Y.J., Park, H.J., Park, H. et al. Effect of His-tag location on the catalytic activity of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Biotechnol Bioproc E* 19, 798–802 (2014). <https://doi.org/10.1007/s12257-014-0089-2>

36. Liu HF, Ma J, Winter C, Bayer R. Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. *MAbs*. 2010;2(5):480-499. doi:10.4161/mabs.2.5.12645

37. Qafari, Seyed Mehdi & Ahmadian, Gholamreza & Mohammadi, Mehdi. (2017). One-step purification and oriented attachment of protein A on silica and graphene oxide nanoparticles using sortase-mediated immobilization. *RSC Advances*. 7. 56006-56015. 10.1039/C7RA12128H.

38. Moks T, Aßrahmsén L, Nilsson B, Hellman U, Sjöquist J, Uhlén M. Staphylococcal protein A consists of five IgG-β-binding domains. *Eur J Biochem*. 1986;156(3):637-643. doi:10.1111/j.1432-1033.1986.tb09625.x

39. Navegantes KC, de Souza Gomes R, Pereira PAT, Czaikoski PG, Azevedo CHM, Monteiro MC. Immune modulation of some autoimmune diseases: the critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity. *J Transl Med*. 2017;15(1):36. Published 2017 Feb 15. doi:10.1186/s12967-017-1141-8

40. Multidrug-resistant organisms detected in refugee patients admitted to a University Hospital, Germany June–December 2015 Reinheimer, Claudia and Kempf, Volkhard A. J. and Göttig, Stephan and Hogardt, Michael and Wichelhaus, Thomas A. and O'Rourke, Fiona and Brandt, Christian, *Eurosurveillance*, 21, 30110 (2016), <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.2.30110>

41. Shutt CK, Pounder JI, Page SR, Schaecher BJ, Woods GL. Clinical evaluation of the DiversiLab microbial typing system using repetitive-sequence-based PCR for characterization of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*. 2005;43(3):1187-1192. doi:10.1128/JCM.43.3.1187-1192.2005

42. Urmann, K., Reich, P., Walter, J.-G., Beckmann, D., Segal, E., and Scheper, T. (2017) *J. Biotechnol.* 257, 171–177

43. Bush K. Past and Present Perspectives on β-Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(10):e01076-18. Published 2018 Sep 24. doi:10.1128/AAC.01076-18

44. Hraβák J, Chudáčková E, Papagiannitsis CC. Detection of carβapenemases in Enterobacteriaceae: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(9):839-853. doi:10.1111/1469-0691.12678
45. Osei Sekyere J, Govinden U, Essack SY. Review of established and innovative detection methods for carβapenemase-producing Gram-negative bacteria. *J Appl Microbiol.* 2015;119(5):1219-1233. doi:10.1111/jam.12918
46. Beβrone C, Moali C, Mahy F, et al. CENTA as a chromogenic substrate for studying beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(6):1868-1871. doi:10.1128/AAC.45.6.1868-1871.2001
47. Wang WJ, Wang Q, Zhang Y, et al. Characterization of β-lactamase activity using isothermal titration calorimetry. *Biochim Biophys Acta Gen Suβj.* 2017;1861(8):2031-2038.
48. [Chowdhury, P. S., Kushwaha, A., Abrol, S., & Chaudhary, V. K. (1994). An Expression System for Secretion and Purification of a Genetically Engineered Thermostable Chimera of Protein A and Alkaline Phosphatase. *Protein Expression and Purification*, 5(1), 89–95. doi:10.1006/prev.1994.1013]
49. [Westermeier, Reiner & Gronau, S. & Becket, P. & Bülles, J. & Schickle, Hanspeter & Theβeling, G.. (2005). *Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations: Fourth Edition.* Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations: Fourth Edition. 1-406. 10.1002/3527603468.]
50. [Yip, T.-T., & Hutchens, T. W. (n.d.). Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography. *Protein Purification Protocols*, 179–190. doi:10.1385/1-59259-655-x:179 + Hober, S., Nord, K., & Linhult, M. (2007). Protein A chromatography for antibody purification. *Journal of Chromatography B*, 848(1), 40–47. doi:10.1016/j.jchromb.2006.09.030]
51. [Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* 2012;4(9):429-434. doi:10.4103/1947-2714.100998]
52. Studier F.W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures // *Protein Expression and Purification.* –2005. –V.41. –P.207–234

53. Grigorenko V.G., Rubtsova M.Yu., Filatova E.V., Andreeva I.P., Mistryukova E.A., Egorov A.M. Cloning, expression of NDM-1 metallo- $\beta$ -lactamase gene and study of catalytic properties of the recombinant enzyme // Mos. Un. Chem. Bul. 2016. Vol. 57, № 2. P. 75-81