

УДК 602.44:543.544.17:577.112

О.М. Рихлюк, А.Ю. Горлов

ВПЛИВ КОНЦЕНТРАЦІЇ ГЛЮКОЗИ В ПОЖИВНОМУ СЕРЕДОВИЩІ НА БІОСИНТЕЗ РЕКОМБІНАНТНОГО АНАЛОГА БІЛКА *gp 120* ВІЛ-1

Contingent screening for specific serological markers of infection ranks high in HIV prophylaxis. Nowadays the most common serological screening practice of HIV is contingent testing to detect serum antibodies against the HIV using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Recombinant analogues of HIV-1 envelope protein *gp 120* are widely used in all commercial ELISA test kits for HIV diagnostics. In this paper we study the production of *rgp 120* in *E. coli* host strain. The research strategies focus on improving the cultivation techniques and manipulating the bacteria physiology. Two fed batch strategies are applied – with continuous and exponential feeding. Exponential feeding is used so that the cells can be grown at the desired growth rate (μ) by programming the bioreactor software. By providing proper nutrient and operation conditions, this strategy allows us reaching a high cell concentration and achieving high yields of recombinant product.

Вступ

Поширення інфекції вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ) набуло в наш час характеру всесвітньої епідемії, охопивши населення практично всіх країн світу. Одним із основоположних методів діагностики ВІЛ-інфекції на сьогодні є імуноферментний аналіз (ІФА), що ґрунтується на взаємодії антигену ВІЛ і специфічних до нього антитіл та виявленні утвореного комплексу за допомогою імуноферментного кон'югату з подальшою візуалізацією за допомогою кольорової реакції з хромогеном. Найбільш імуногенним білком ВІЛ є білок оболонки вірусу – *gp 120*, рекомбінантні аналоги якого використовуються в усіх сучасних ІФА-тест-системах. В сучасному біотехнологічному виробництві рекомбінантних білків використовують клітини різноманітних мікроорганізмів. Однак найпоширенішим бактеріальним продуцентом рекомбінантних білків є кишкова паличка *Escherichia coli* (*E. coli*) [1]. Для *E. coli* створений великий банк плазмідних векторів, що дає змогу підібрати найбільш продуктивну та стабільну систему експресії цільового гена.

Технологія високогустинного культивування (ВГК) *E. coli* дає змогу отримувати до 190 г л^{-1} вологої біомаси. Така технологія заснована на підживленні бактеріальної культури головним лімітуючим фактором росту – глюкозою. Однак відомо, що рекомбінантні аналоги білків ВІЛ є дуже токсичними для клітин *E. coli*, що призводить до зменшення плазмідної копійності, а отже, до низького виходу цільового продукту та його протеолізу [2]. Також відомі випадки відсутності імуногенних властивостей білків ВІЛ, виділених із біомаси культури, що культивувалася з використанням методів ВГК [3]. Ці явища зумовлені насамперед надлишком глю-

кози в поживному середовищі, що за високої концентрації здатна інгібувати як ріст культури, так і процес біосинтезу цільового продукту (явище катаболічної репресії). Саме тому постає завдання оптимізувати умови культивування штаму продуцента рекомбінантного аналога *gp 120* таким чином, щоб досягти максимального співвідношення якості та кількості кінцевого продукту.

Постановка задачі

Метод ІФА є дуже чутливим. Тому до ступеня чистоти рекомбінантних білків, що входять до складу системи, висуваються жорсткі вимоги. Доведено, що на ступінь чистоти та функціональний стан цільового рекомбінантного продукту безпосередньо впливають умови культивування його штаму продуцента.

Мета дослідження – підбір оптимальних умов високогустинного культивування штаму продуцента білка *rgp 120* з реалізацією стратегій періодичного та експоненціального підживлення культури субстратом.

Теоретичне обґрунтування стратегії підживлення

Вперше на лімітування процесів росту культур клітин субстратами ферментативних реакцій звернув увагу Ж. Моно. Субстрати, що обмежують ріст мікробних популяцій, отримали назву лімітуючих.

Було показано, що залежність швидкості росту клітинної культури від концентрації лімітуючого субстрату можна подати у вигляді

$$\frac{dN}{dt} = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} N, \quad (1)$$

де N – число мікробних клітин; μ_{\max} – коефіцієнт пропорційності, що отримав назву *граничної максимальної швидкості росту*; K_s – параметр, що характеризує спорідненість субстрату до клітин культури.

З рівняння (1) слідує, що:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S}. \quad (2)$$

Тоді μ є коефіцієнтом пропорційності, що характеризує клітинний ріст. Це значення прийнято називати *питомою швидкістю росту*. Розмірність питомої швидкості росту обернено пропорційна часу: год⁻¹. Рівняння (2) отримало назву *рівняння Моно*.

На основі літературних даних було показано [4], що підтримання значення питомої швидкості росту культури на постійному рівні сприяє подовженню експоненціальної фази росту бактеріальної культури, а отже, дає можливість отримати максимальний вихід вологої біомаси.

Контроль за значенням питомої швидкості росту під час процесу високогустинного культивування здійснюється за допомогою підвищення концентрації глюкози в поживному середовищі.

Розрізняють дві основні стратегії підживлення культури: з періодичною подачею субстрату та експоненціальну стратегію підживлення.

Стратегія підживлення з періодичною швидкістю подачі субстрату ґрунтується на спостереженні за зміною показників рН та рівня розчиненого кисню (DO) в поживному середовищі. Коли значення даних показників починають зростати внаслідок вичерпування глюкози в середовищі, обумовлена кількість субстрату подається в біореактор. Головним недоліком такої стратегії є неможливість підтримання заданої питомої швидкості росту культури.

Експоненціальна стратегія підживлення дає змогу підтримувати постійне значення питомої швидкості росту культури. Утворення оцтової кислоти – продукту клітинного метаболізму, що інгібує ріст, може бути мінімізоване підтриманням швидкості росту культури у вибраному діапазоні. До того ж концентрація глюкози в поживному середовищі впродовж усього процесу підтримується на рівні нуля без коливань, а отже, викликає мінімум збурень у клітинному метаболізмі. Швидкість подачі субстрату в біореактор у момент часу t вираховується з рівняння

$$F(t) = F_0 \cdot \exp(\mu_3 \cdot t) = \text{л} \cdot \text{год}^{-1},$$

де μ_3 – задана швидкість росту; t – час; коефіцієнт F_0 – функція від X_0 (початкова концентрація біомаси в біореакторі).

Матеріали і методи

Бактеріальні штами-реципієнти і плазміди.

Штам продуцент білка *gp 120* – *E. coli GR-gp120/pET24(a)* був створений на основі системи для експресії реципієнта *E. coli Origami B(DE3)* [*F-ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm lacY1 aphC (DE3) gor522::Tn10 trxB (KanR, TetR)*] трансформацією бактеріальних клітин плазмідним вектором *pET24a(+)* з клонованою ділянкою гена *Env*, що кодує послідовність області V3 вірусного білка *gp 120* ВІЛ-1. Біосинтез цільового білка контролюється промотором фагу T7 та індукується за допомогою ізопропіл- β -D-тіо-галактопіранозиду (ІПТГ). Конструкція містить ген резистентності до канаміцину, а також послідовність, що відповідає за N-кінцевий полілінкер з шести залишків гістидину.

Приготування компетентних клітин проводили за стандартним протоколом. Суспензію бактеріальних клітин, що містила антибіотики: 50 мкг/мл канаміцину та 12,5 мкг/мл тетрацикліну, висівали на агаризоване поживне середовище LB (1 % бактотриптон, 0,5 % дріжджового екстракту, 1 % NaCl, 1,5 % агару “Difco”, рН = 7,2). Для відбору найбільш продуктивного клону зразки біомас аналізували за допомогою електрофорезу в редуруючих умовах у 15 %-ному ПААГ з додаванням 1 % додецилсульфату натрію з подальшим фарбуванням гелю розчином Кумасі R-250 за методом Лемлі [5]. Вміст цільового білка в бактеріальних клітинах оцінювали денсіметрично за допомогою програмного забезпечення GelScan (BioSciТес, Німеччина).

Поживні середовища та умови культивування. Для всіх трьох культивувань було вибрано поживне середовище складу (г/л): пептон – 5,0; гідролізат казеїну – 5,0; дріжджовий екстракт – 5,0; глюкоза – 8,0. Як буферну основу було використано фосфатний сольовий розчин складу (г/л): Na₂HPO₄×12H₂O – 14,3; KH₂PO₄ – 3,0; NH₄Cl – 1,0; NaCl – 5,0. Додатково для всіх трьох культивувань було використано 1 М MgSO₄ (1 мл/л) та 1 М CaCl₂ (0,1 мл/л). Для запобігання піноутворенню до поживного середовища було додано піногасник Antifoam 204 (Sigma, США) до кінцевої концентрації 1 % (1 мл/л).

Для реалізації стратегій підживлення використовували 10 %-ний розчин глюкози. Культивування проводили за наявності 50 мг/л канаміцину.

Для отримання нічної культури розморожену аліквоту (0,25 мл) музейної культури штаму-продуцента *E. coli GR-gp120/pET24(a)* пересівали в колбу, що містить 0,2 л середовища LB (1 % бактотрипону, 0,5 % дріжджового екстракту, 1 % NaCl, pH = 7,2) [6]. Культуру вирощували за наявності 50 мг/л канаміцину в умовах безперервного перемішування (140 об/хв) за 30 °С протягом 18 год.

Нічну культуру вносили у ферментер Bioflo Celligen 115 (New Brunswick, Німеччина) з робочим об'ємом 5,6 л. Культивування вели за постійної температури 37 °С. Швидкість подачі повітря (0,05–5 л/хв) і кількість обертів мішалки (200–1000) контролювалися в каскадному режимі для забезпечення протягом усього процесу значення розчиненого кисню на рівні 75 % (значення 100 % було відкаліброване за 5 л/хв, 1000 об/хв). Значення pH було встановлене на рівні 7,1 та коригувалося контролером системи за допомогою 20 %-ного розчину NaOH та 2н розчину H₂SO₄. Індукцію біосинтезу цільового білка проводили внесенням у біореактор розчину індуктора ІПТГ до кінцевої концентрації 1 мМ. Подальший процес продовжували протягом ще 3–4 год за цих же умов. По завершенні процесу клітинну біомасу відділяли центрифугуванням при 7000 g протягом 20 хв. Отриману біомасу запаювали в пакети та заморожували за –70 °С.

Ріст культур супроводжувався вимірюванням оптичної густини при довжині хвилі 600 нм за допомогою спектрофотометра (DR5000, HACH, Німеччина). Як компенсуючий розчин було використано поживне середовище. Якщо значення оптичної густини перевищувало 0,6, зразок розводили у 10 разів 0,9 %-ним (маса/об'єм) розчином NaCl. Концентрація глюкози в поживному середовищі визначалася гексокіназа/глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназним методом (Glucose (HK) Assay Kit, GANK-20, Sigma).

Зразки досліджувались у мікропланшетах із чотирма паралелями для кожного зразка.

Наважки по 10 г вологої біомаси ресуспендували в розчині для лізису (20 мМ Трис-НСІ pH 8,0; 10 мМ Na₂-ЕДТА; 0,1 % Тритон Х-100; 1 мМ ФМСФ; 0,04 мг/мл лізоциму). Інкубували суспензію протягом 60 хв за кімнатної температури. Суспензію тричі заморожували-відтаювали та обробляли розчином ДНКаз (кін-

цева концентрація 6 од./мл) за наявності 20 мМ MgSO₄. Тільця включення відділяли центрифугуванням у режимі 10000 g протягом 25 хв за температури 10 °С. Відмивку ТВ проводили в режимі 6 циклів гомогенізації центрифугування. Осад ТВ ресуспендували в буферному розчині складу: 50 мМ Na₂CO₃, pH 10,2; 0,5 М NaCl; 1 мМ ФМСФ; 0,1% Тритон Х-100, та центрифугували в режимі 10000 g протягом 25 хв за температури 10 °С. Цикл повторювали ще 3 рази. Останні 2 цикли відмивки проводили в тому ж режимі деіонізованою водою. Отриманий осад відмитих ТВ розчиняли в буферному розчині складу 8 М сечовини; 0,5 М NaCl; 1 мМ фенілметилсульфонілфториду (ФМСФ); 20 мМ Трис-НСІ pH 8,0; 20 мМ імідазолу протягом 16–18 год на магнітній мішалці за температури 4 ± 2 °С. Надосадову рідину освітляли центрифугуванням в режимі 10000 g протягом 25 хв за температури 10 °С.

Хроматографічну очистку цільового білка проводили за допомогою хроматографічної системи Biological LP (Bio-Rad, США), застосовуючи металхелатний сорбент Toyopearl-AF-Chelate-650 (Tosoh, Японія).

Результати і їх обговорення

Нами було запропоновано дві стратегії культивування штаму продуцента *E. coli GR-gp120/pET24(a)* – культивування з періодичною подачею субстрату та експоненціальну стратегію підживлення. Для контролю також було проведено культивування в стандартному режимі без додавання субстрату.

Культивування з періодичною подачею субстрату. Процес продовжувався протягом 4,5 год у режимі генерації біомаси і ще 3 год у режимі накопичення цільового білка. Рівень розчиненого кисню протягом процесу зменшувався пропорційно до кількості утилізованої культурою глюкози. Щойно концентрація глюкози стала близькою до нуля, рівень розчиненого кисню в середовищі почав зростати. Насос для подачі субстрату було увімкнено в режимі подачі зі швидкістю 2 мл/хв, що фактично відповідало 12 г сухої глюкози на годину. Підживлення продовжувалося 1 год до наступного стрибка значення розчиненого кисню в середовищі.

Індукція біосинтезу цільового продукту була проведена через 4,5 год після початку культивування по досягненні значення $OG_{600} = 4,33$.

Культивування з експоненціальною стратегією підживлення. Процес продовжувався протягом 3 год у режимі генерації біомаси і ще 3 год у режимі накопичення цільового білка. Насос для подачі субстрату був запрограмований на роботу в експоненціальному режимі з метою підтримання швидкості росту культури на рівні $0,9 \text{ год}^{-1}$. Початкове поживне середовище не містило глюкози, підживлення було розпочато одразу після внесення нічної культури.

Індукція біосинтезу цільового продукту була проведена через 4 год після початку культивування по досягненні значення $ОГ_{600} = 4,8$.

Культивування без додавання субстрату. Процес продовжувався протягом 4 год у режимі генерації біомаси і ще майже 4 год у режимі накопичення цільового білка. На початку п'ятої години процесу концентрація глюкози в середовищі була близькою до нуля, а рівень розчиненого кисню в середовищі почав стрімко зростати. Оскільки головний лімітуючий субстрат у середовищі було вичерпано, ріст культури загальмувався, а через сім годин після початку процесу культура перебувала на стаціонарній фазі.

Індукція біосинтезу цільового продукту була проведена через 2 год після початку культивування по досягненні значення $ОГ_{600} = 1,33$.

Мікроскопічний контроль культури показав, що цільовий білок є надзвичайно токсичним для клітин *E. coli*. На початку культивування морфологічний стан культури був типовим, клітини активно ділилися. Але після проведення індукції, під час мікроскопічного контролю, ми спостерігали видовжені клітинні форми, тонкі клітинні стінки, неподілені клітинні форми, наявність клітин без тілець включень, що свідчить про активну елімінацію вбудованої плазміди.

При порівнянні кривих росту *E. coli GR-gp120/pET24(a)* за різних умов культивування (рис. 1) було встановлено, що експериментальні криві мали характерну для росту мікроорганізмів S-подібну (сигмоїдну) форму. Для їх апроксимації використовували логістичну функцію Ферхюльста

$$x = \frac{A - C}{1 + 10^{\alpha + \beta t}} + C, \quad (3)$$

де C і A – нижня та верхня асимптоти функції відповідно; α і β – показники, що визначають поведінку функції. Значення кінетичних параметрів для кривих: 7 – $A = 5,48$, $C = 0,004$, $\alpha = 1,98$, $\beta = -0,68$; 8 – $A = 11$, $C = 0,03$, $\alpha = 2,27$,

$\beta = -0,50$; 9 – $A = 12,5$, $C = 0,11$, $\alpha = 2,36$, $\beta = -0,51$.

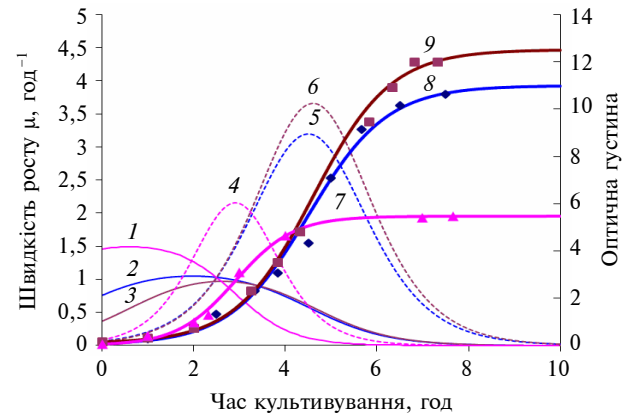


Рис. 1. Криві росту *E. coli GR-gp120/pET24(a)* за різних умов культивування: 1–3 – показники питомої швидкості росту dx/dt , 4–5 – показники абсолютної швидкості росту dx/dt , 7–9 – значення оптичної густини культури $ОГ_{600}$; 1, 4, 7 – культивування без подачі субстрату, 2, 5, 8 – з періодичною подачею субстрату, 3, 6, 9 – для експоненціальної стратегії

Застосування методу математичного моделювання для опису динаміки росту продуцента [7] дає можливість визначити кінетичні показники, що характеризують фізіологічний стан клітин залежно від вибору стратегії культивування. Так, значення величини максимальної питомої швидкості росту (μ_{max}) при культивуванні без додавання субстрату становило $0,58 \text{ год}^{-1}$, тоді як при культивуванні з постійною подачею

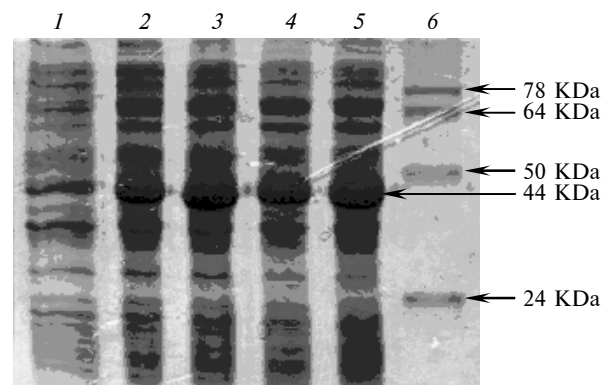


Рис. 2. Динаміка накопичення рекомбінантного аналога білка *gp120 ВІЛ-1* у клітинах продуцента *E. coli GR-gp120/pET24(a)* залежно від умов культивування: 1 – до індукції; 2 – без додавання субстрату (3 год після індукції); 3 – з періодичним додаванням субстрату (3 год після індукції); 4, 5 – з експоненціальною стратегією підживлення (1 і 3 год після індукції відповідно); 6 – маркер стандартних молекулярних мас (Merck, Німеччина)

Таблиця. Вихід продуктів залежно від умов культивування

Метод культивування	Вихід біомаси, г л ⁻¹	Вихід очищеного білка з 1 г біомаси, мг г ⁻¹	Вихід цільового білка від нанесеного на колонку, %
Без додавання субстрату	5,0	1,92	7,5
З періодичним додаванням	15,8	5,5	16,4
Експоненціальна стратегія	17,6	13,26	23,4

субстрату – 0,78 год⁻¹. Реалізація експоненціальної стратегії підживлення дала змогу підтримувати значення μ на постійному рівні – 0,8 год⁻¹, якомога довший проміжок часу. Це дало можливість максимально подовжити експоненціальну фазу росту культури та отримати найвищий вихід вологої біомаси та цільового продукту.

З електрофореграми, що відображає динаміку накопичення цільового білка (рис. 2), слідує, що максимальне накопичення цільового продукту спостерігалось при культивуванні з використанням експоненціальної стратегії підживлення.

Денситометричний аналіз [8] отриманої електрофореграми показав, що максимальний вміст цільового білка (25,2 %) серед усіх білкових фракцій лізату спостерігався при культивуванні з експоненціальною стратегією підживлення.

Зведені результати подані в таблиці.

Хроматографічна очистка підтвердила результати денситометричного аналізу. Найвищий вміст білка *rgp* 120 (23,4 %) спостерігався в біомасі, отриманій з використанням технології експоненціального підживлення.

Висновки

Встановлено, що реалізація технології високогустинного культивування штаму *E. coli GR-gp120/pET24(a)* – продуцента рекомбінантного аналога білка *gp* 120 ВІЛ-1 – з використанням стратегії експоненціального підживлення дає можливість досягти майже у 7 разів вищий вихід цільового продукту (13,26 проти 1,92 та 5,5 мг очищеного білка з 1 г біомаси) порівняно зі стандартними методиками культивування при однакових затратах сировини.

Питомий вміст цільового білка в загальному пулі лізованої біомаси, отриманої за експоненціальною стратегією підживлення, становив 25,2 %.

Визначено оптимальну швидкість росту культури на рівні 0,8 год⁻¹ та оптимальну концентрацію розчину глюкози для здійснення підживлення – 10 %.

У перспективі будуть проведені дослідження зі зменшення токсичності *rgp* 120 для клітин продуцента.

1. J. Shiloacha and R. Fass, "Growing E.coli to high cell density – a historical perspective on method development", *Biotechnology Advances*, vol. 23, pp. 345–357, 2005.
2. Y. Morikawa et al., "HIV-1 envelope protein *gp* 120 expression by secretion in E. coli: assessment of CD4 binding and use in epitope mapping", *J. of Virological Method*, vol. 29, pp.105–114, 1990.
3. D.J. Korz et al., "Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of Escherichia coli", *J. of Biotechnology*, vol. 39, pp. 59–65, 1995.
4. J. Aulicino and M. Hermida, "Developing an automatically controlled feeding process in an E.coli fermentation process for recombinant protein production", *The Science&Business of Biopharmaceuticals*, vol. 6, pp. 2–7, 2010.
5. U. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, vol. 227, pp. 680–685, 1970.
6. *pET System Manual*, Novagen, 2003, 68 p.
7. Jong Hyun Choia et al., "Production of recombinant proteins by high cell density culture of Escherichia coli", *Chem. Eng. Sci.*, vol. 61, pp. 876–885, 2006.
8. K. Hellmuth et al., "Effect of growth rate on stability and gene expression of recombinant plasmids during continuous and high cell density cultivation of Escherichia coli TG1", *J. of Biotechnology*, vol. 32, pp. 289–298, 1994.