

Одержання біфункціональних молекул, специфічних до антигену та Fc-фрагментів антитіл, методом злиття scFv-антитіл із стафілококовим білком А

О. С. Олійник, А. А. Кабернюк, Т. А. Редчук, Д. В. Колибо, С. В. Комісаренко

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України
Вул. Леонтовича, 9, Київ, Україна, 01601

lenaoliinyk@mail.ru

Мета. Розробити підхід для детекції scFv та їхніх комплексів з антигенами. **Методи.** Сконструювано гібридні білки, які містять послідовності scFv до субодиниці В дифтерійного токсину і стафілококового білка А, та з використанням імунохімічних методів охарактеризовано отримані біфункціональні молекули. **Результати.** Показано, що scFv, злиті з білком А, та їхні комплекси з антигеном можна ефективно виявляти міченими імуноглобулінами довільної антигенної специфічності. **Висновки.** Злиття з фрагментом білка А є перспективним підходом, що дозволяє підвищити ефективність застосування scFv в імуноферментному аналізі. Отримані scFv, об'єднані із білком А, можуть бути використані при створенні тест-систем для виявлення дифтерійного токсину.

Ключові слова: scFv, дифтерійний токсин, біфункціональні молекули.

Вступ. Одноланцюгові варіабельні фрагменти (scFv – від англ. single chain variable fragment) антитіл містять варіабельні домени важкого та легкого імуноглобулінових ланцюгів, об'єднані гнучким лінкером. scFv зазвичай володіють такими ж специфічністю та афінністю, як і вихідні повнорозмірні антитіла [1], хоча не містять C_L, C_{H1} та Fc-фрагментів імуноглобулінів.

scFv знайшли своє застосування у багатьох прикладних і фундаментальних напрямках, зокрема, як повнорозмірні антитіла, їх також активно використовують в імунодіагностиці. На жаль, досі не існує універсальних систем для детекції scFv та їхніх комплексів з антигеном. Ця проблема і наразі залишається актуальною, хоча й запропоновано низку методичних підходів для спрощення детекції scFv.

Широко поширеним підходом є отримання scFv, злитих з бактеріальною лужною фосфатазою

[2, 3]. Такі молекули містять одночасно і фрагмент антитіла, і фермент, який каталізує реакцію, внаслідок чого візуалізуються результати аналізу та стає можливим виявлення антигену в прямому імуноферментному аналізі. Цікавий підхід розроблено авторами [4] – вони отримали scFv, мічені стрептавідин-зв'язувальним білком, що дозволило використовувати для детекції комерційно доступний кон'югат стрептавідину з пероксидазою. Одержано й scFv, злиті із стрептавідином. У цьому разі для детекції застосовано біотинільовану пероксидазу [5].

Варто згадати також scFv, об'єднані в різних комбінаціях із константними доменами [6], та гібриди scFv із флуоресцентними білками [7]. В першому випадку для детекції використовують комерційно доступні мічені антитіла, специфічні до Fc-фрагментів, у другому – проводять прямий флуоресцентний аналіз.

Для спрощення детекції scFv в імуноферментному аналізі в даній роботі запропоновано об'єд-

нати scFv з фрагментом білка А *Staphylococcus aureus*. Кожний з доменів стафілококового білка А здатний зв'язуватися з константними ділянками імуноглобулінів багатьох видів ссавців [8], що робить його перспективним «ф'южин»-партнером для позбавлених константних доменів scFv. Так, на початку 90-х років минулого століття було показано, що подібні гібриди scFv та повнорозмірного білка А успішно працюють у реакції подвійної імунодифузії в гелі [9] та в імуноблотингу [10]. Оскільки білок А реагує з ділянками антитіл, розташованими поза активним центром, антигенна специфічність антитіла є несуттєвою для зв'язування з білком А. Отже, для детекції scFv-антитіл, злитих з фрагментом білка А, придатним є широкий спектр мічених імуноглобулінів.

Матеріали і методи. Створення рекомбінантних плазмід для експресії гібридного білка SpA-scFv в *Escherichia coli*. Для ампліфікації послідовності, що кодує фрагмент білка А (його E-, D-, A- та B-домени) використано пару праймерів з наведеною послідовністю –

сенсовий:

GTGTGCGGCCGCGAGCTGCGCAACACGATGAAGC;

антисенсовий:

GTGGTGCTCGAGTTGTTTTGGTGC.

У послідовності праймерів підкреслено сайти для ендонуклеаз рестрикції *NotI* та *XhoI*. ПЛР-ампліфікацію проводили в такому режимі: 5 хв – денатурація за $t = 94$ С, 30 циклів за схемою: 30 с – 94 С, 30 с – 63 С, 30 с – 72 С і на самкінець добудова протягом 7 хв за $t = 72$ С. Послідовність, що кодує фрагмент білка А, об'єднували з послідовністю *pET-22b* за сайтами для ендонуклеаз рестрикції *NotI* та *XhoI*. Отриманою лігазною сумішшю трансформували клітини *E. coli* DH10B і відбирали колонії – носії сконструйованої плазмиди *pSpA22b*.

Послідовності scFv субклонували у вектор *pSpA22b* за сайтами для ендонуклеаз *NotI* та *NcoI*. Продуктом слугував штам *E. coli* Rosetta. Усі процедури проводили згідно з [11] та рекомендаціями виробника. Використовували реактиви виробництва фірми «Fermentas» (Литва).

Очищення злитих білків SpA-scFv. Виділення проводили на колонці об'ємом 1 мл із сорбентом

Ni-NTA-агарозою з розчинної та нерозчинної фракцій. В останньому випадку для переведення в активну форму здійснювали рефолдинг згідно з методикою, описаною раніше [12]. Очищені білки аналізували електрофорезом у 10 %-му ПААГ [13]. Одразу після виділення зразки змішували (1:1) з гліцеролом і зберігали за $t = -20$ °С.

Імуноферментний аналіз. Використовували 96-лункові планшети виробництва «Spectar» (Сербія). Усі розчини додавали по 100 мкл на лунку та послідовно інкубували протягом 1 год за $t = 37$ С, після кожної інкубації лунки тричі промивали. Антигени (рекомбінантна субодиниця В дифтерійного токсину [14] як специфічний або сироватковий альбумін бика для негативного контролю) наносили в концентрації 10 мкг/мл у ЗФР (0,8 % NaCl, 0,02 % KCl, 0,144 % Na_2HPO_4 , 0,024 % KH_2PO_4 , pH 7,4). Потім інкубували розчин 1 %-го знежиреного молока у ЗФР. Очищені SpA-scFv вносили в буфері ТФБ (ЗФР, що містив 0,04 % твін-20). Для детекції SpA-scFv використовували поліклональні антитіла кроля, кон'юговані з пероксидазою хрому («Sigma», США) в буфері ТФБ (розведення 1:10000). Після цього додавали 100 мкл розчину, що містив 2 мг ортофенілендіаміну, 5 мл дистильованої води та 5 мкл пероксиду водню. Через 20 хв реакцію зупиняли, додаючи по 50 мкл на лунку 2 М H_2SO_4 . Результати аналізу вимірювали за допомогою ІФА-ридера EL 800 («Bio-Tech», США) за довжини хвилі 490 нм.

Для визначення необхідного розведення антитіл, кон'югованих з пероксидазою, як антиген вносили розчин SpA-scFv (5 мкг/мл у ЗФР), інкубували протягом 1 год за $t = 37$ С, після чого додавали кон'юговані з пероксидазою поліклональні антитіла кроля та кози або моноклональні IgM миші («Sigma») у буфері ТФБ, послідовно зменшуючи їхню концентрацію вдвічі.

Результати і обговорення. Створення рекомбінантних плазмід для експресії гібридного білка SpA-scFv в *E. coli*. Отримано конструкції для експресії гібридних білків, що містять у своєму складі послідовність scFv-антитіла та фрагмента стафілококового білка А. Амінокислотну послідовність клонованого фрагмента білка А наведено на рис. 1. Послідовності scFv відібрано з імунної

Domain D
 1 HAAQHDEAQQNAFYQVLMNPNLNADQRNGFIQSLKDDPSQSANVLGEAQKLNDSSQAPKAD
 Domain E
 61 AQQNNFNKDDQSSAFYEIILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQAPK
 Domain A
 119 ADNNFNKEQQNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLSEAKKLNESQAPK
 Domain B
 177 ADNNFNKEQQNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLSEAKKLNDAAQAPK

Рис. 1. Амінокислотна послідовність клонованого фрагмента білка А *Staphylococcus aureus* (згідно з результатами секвенування нуклеотидної послідовності, проведеного у відділенні молекулярної діагностики Української лабораторії якості і безпеки продукції агропромислового комплексу Національного аграрного університету)

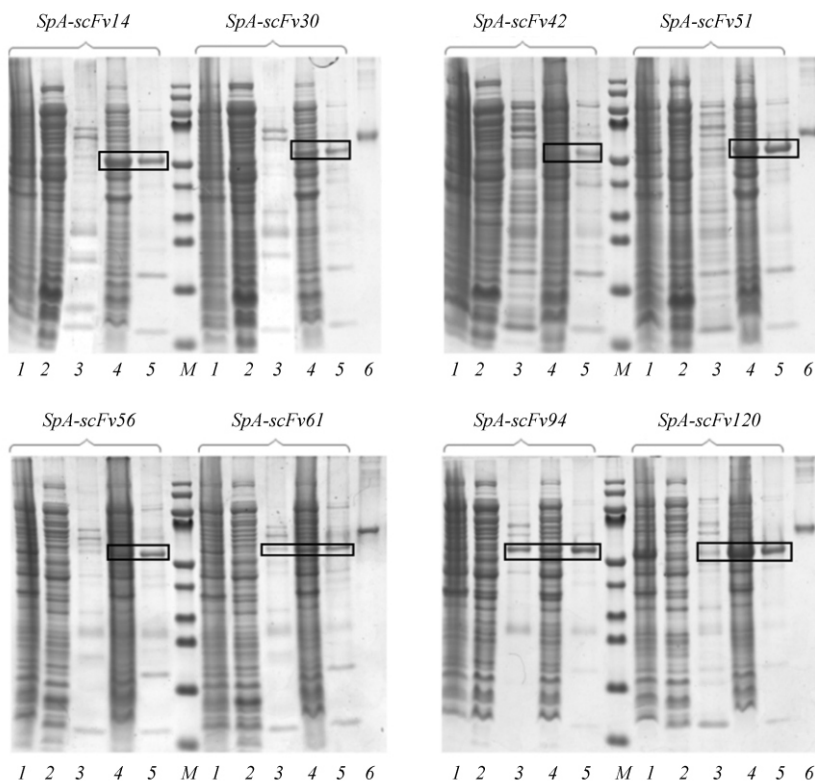


Рис. 2. Аналіз клітинних лізатів та виділених SpA-scFv: 1 – тотальний лізат; 2 – розчинна фракція білків; 3 – білки, виділені з розчинної фракції; 4 – нерозчинна фракція білків; 5 – білки, виділені з нерозчинної фракції; M – маркери молекулярної маси (170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17, 10 кДа); 6 – сироватковий альбумін бика (0,5 мкг). Назву клонів підписано над фігурними дужками

бібліотеки імуноглобулінових генів миші. Усі вісім scFv були специфічними до субодиниці В дифтерійного токсину [12].

Метою об'єднання scFv-антитіл та стафілококового білка А було одержання біфункціонального гібридного білка, здатного в імуноферментному аналізі розпізнавати антиген і детектуватися міченими антитілами довільної антигенної специфічності. Додатково передбачалося дослідити, як вплине фрагмент білка А на експресію цільового білка, зокрема, на вихід розчинного продукту, оскільки об'єднання з одним або кількома доменами білка А часто дозволяє підвищити розчинність цільового білка [15].

Цільовий білок виділяли паралельно і з розчинної, і з нерозчинної фракцій (в останньому випадку – з подальшим рефолдингом). Лізати проду-

центів SpA-scFv та отримані після металоафінної хроматографії елюати аналізували електрофорезом у ПААГ (рис. 2). Як видно з цього рисунка, цільовий білок експресувався переважно у нерозчинній формі, а виділені з розчинної фракції білки містили велику кількість домішок, вірогідно, через низький питомий внесок цільового білка. Проте для клонів SpA-scFv61, SpA-scFv120 і SpA-scFv94 подальша оптимізація умов виділення, імовірно, дозволить виділяти з розчинної фракції продукт достатнього ступеня чистоти.

Імунохімічна характеристика отриманих злитих білків SpA-scFv. Щоб дослідити, як отримані злиті білки можуть взаємодіяти з імуноглобулінами різних тварин, ми використали кон'юговані з пероксидазою хрому поліклональні антитіла кроля, специфічні до імуноглобулінів миші, поліклональ-

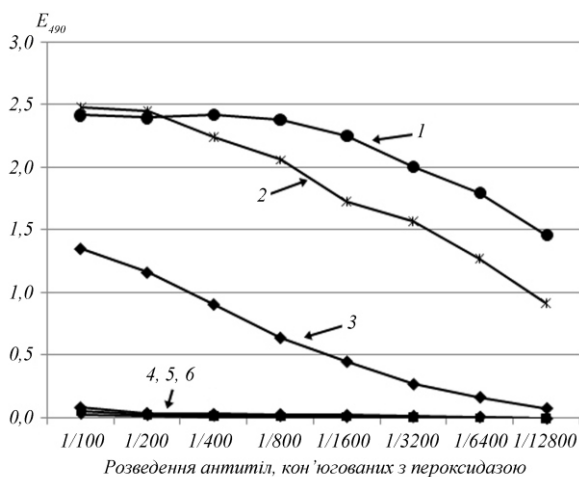


Рис. 3. Розпізнавання отриманого злитого білка SpA-scFv30 антитілами козла (1), кроля (2) та моноклональними IgM миші (3), кон'югованими з пероксидазою хрому; 4, 5, 6 – розпізнавання сироваткового альбуміну бика відповідними кон'югатами (негативний контроль)

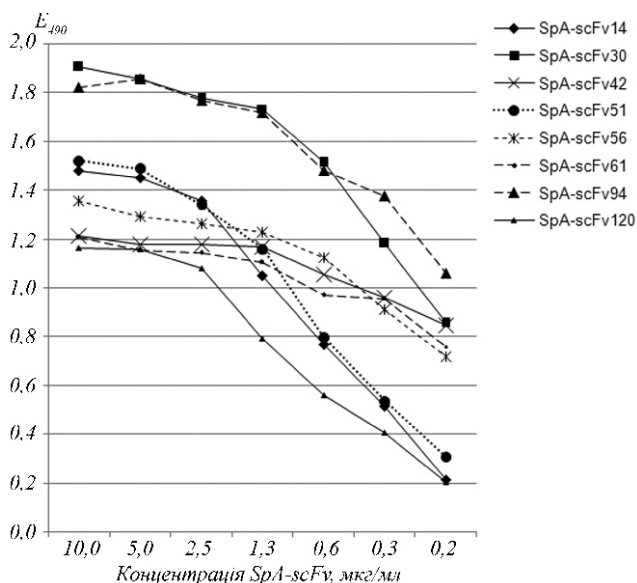


Рис. 4. Розпізнавання антигену (субодиниці В дифтерійного токсину) очищеними SpA-scFv

ні антитіла кози, специфічні до імуноглобулінів людини, та моноклональні мишачі антитіла класу М, що втратили здатність розпізнавати антиген (Т7-tag). Кон'югати імуноглобулінів цих видів тварин широко використовують для імуноферментного аналізу і вони є відносно доступними. Варто зазначити, що афінність білка А стосовно антитіл різних класів та підкласів варіює [8]. Афінні сорбенти з іммобілізованим білком А дозволяють виділити більше 90 % антитіл із сироваток кроля та

миші, близько 80 % – із сироваток людини та коня і близько 30 % – імуноглобулінів із сироваток кози чи вівці [16].

На рис. 3 представлено результати імуноферментного аналізу, в якому як антигени використано виділені SpA-scFv30 та сироватковий альбумін бика (негативний контроль). Усі кон'югати розпізнавали SpA-scFv, при цьому ефективність роботи кон'югатів була не нижчою, ніж при детекції специфічних антигенів. Для порівняння: кон'югат мишачих моноклональних антитіл взагалі не розпізнавав антиген, до якого він був специфічним, але зберігав пероксидазну активність. Робоче розведення кон'югованих імуноглобулінів кози при визначенні антитіл людини становить 1:15000, а кролячих антимишачих імуноглобулінів – 1:3000. Отримані результати підтвердили, що злиті білки SpA-scFv здатні взаємодіяти з міченими імуноглобулінами.

Показано, що для детекції можна використовувати навіть кон'югати антитіл, які втратили антигензв'язувальну активність. Крім того, встановлено, що для детекції SpA-scFv цілком придатні мічені антитіла кози попри те, що останні не є «оптимальними партнерами» для стафілококового білка А.

На наступному етапі роботи досліджували антигензв'язувальні властивості отриманих злитих білків SpA-scFv. Вихідні scFv були специфічними до субодиниці В дифтерійного токсину. Відповідно здійснили імуноферментний аналіз, де як антигени використовували рекомбінантну субодиницю В дифтерійного токсину (позитивний контроль) та сироватковий альбумін бика (негативний контроль). Усі клони продемонстрували ефективне розпізнавання цільового антигену, що свідчить про збереження антигензв'язувальної функції у scFv після об'єднання з фрагментом білка А (рис. 4), та не розпізнавали сироватковий альбумін бика (даних не наведено).

Одержані результати вказують на перспективність використання гібридних білків scFv-стафілококовий білок А в імуноферментному аналізі, а також підтверджують, що scFv, відібрані нами раніше з імунної бібліотеки, можна застосувати при створенні імуноферментних тест-систем для виявлення дифтерійного токсину.

O. S. Oliinyk, A. A. Kaberniuk, T. A. Redchuk, D. V. Kolibo,
S. V. Komisarenko

Construction of bifunctional molecules specific to antigen and antibody's Fc-fragment by fusion of scFv-antibodies with staphylococcal protein A

Summary

Aim. To develop approach for detection of scFv and their complexes with antigens. **Methods.** The fusion proteins, which include sequences of scFv and staphylococcal protein A, were constructed and the obtained bifunctional molecules were immunochemically analysed. **Results.** It was shown, that scFv fused with protein A and their complexes with antigens are effectively recognized by labelled immunoglobulins with unrestricted antigenic specificity. **Conclusions.** The fusion of scFv with protein A fragment is a perspective approach to increase the efficiency of application in ELISA. The obtained scFv, fused with protein A, could be used for development of test-systems for the detection of diphtheria toxin.

Keywords: scFv, diphtheria toxin, bifunctional molecules.

E. C. Олейник, А. А. Кабернюк, Т. А. Редчук, Д. В. Колибо,
С. В. Комисаренко

Получение бифункциональных молекул, специфичных к антигену и Fc-фрагменту антител, методом слияния scFv-антител со стафилококковым белком А

Резюме

Цель. Разработать подход для детекции scFv и их комплексов с антигенами. **Методы.** Сконструированы гибридные белки, содержащие последовательности scFv к субъединице В дифтерийного токсина и стафилококкового белка А, и с использованием иммунохимических методов охарактеризованы полученные бифункциональные молекулы. **Результаты.** Показано, что scFv, слитые с белком А, и их комплексы с антигеном эффективно распознаются мечеными иммуноглобулинами произвольной антигенной специфичности. **Выводы.** Слияние с фрагментом белка А является перспективным подходом, позволяющим повысить эффективность использования scFv в иммуноферментном анализе. Полученные scFv, объединенные с белком А, могут быть использованы при создании тест-систем для выявления дифтерийного токсина.

Ключевые слова: scFv, дифтерийный токсин, бифункциональные молекулы.

PERELIK LITERATURI

- Holliger Ph., Hudson P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains // Nat. Biotechnol.—2005.—23, N 9.—P. 1126–1136.
- Wang S. H., Zhang J. B., Zhang Z., P. Zhou Y. F., Yang R. F., Chen J., Guo Y. C., You F., Zhang X. E. Construction of single chain variable fragment (ScFv) and BiscFv-alkaline phosphatase fusion protein for detection of *Bacillus anthracis* // Anal. Chem.—2006.—78, N 4.—P. 997–1004.
- Rau D., Kramer K., Hock B. Single-chain Fv antibody-alkaline phosphatase fusion proteins produced by one-step clo-

ning as rapid detection tools for ELISA // J. Immunoas. Immuochem.—2002.—23, N 2.—P. 129–143.

- Aubrey N., Devaux C., di Luccio E., Goyffon M., Rochat H., Billiald P. A recombinant scFv/streptavidin-binding peptide fusion protein for the quantitative determination of the scorpion venom neurotoxin AahI // Biol. Chem.—2001.—382, N 11.—P. 1621–1628.
- Kipriyanov S. M., Breitling F., Little M., Dubel S. Single-chain antibody streptavidin fusions: tetrameric bifunctional scFv-complexes with biotin binding activity and enhanced affinity to antigen // Hum. Antibodies Hybridomas.—1995.—6, N 3.—P. 93–101.
- Braren I., Greunke K., Umland O., Deckers S., Bredehorst R., Spillner E. Comparative expression of different antibody formats in mammalian cells and *Pichia pastoris* // Biotechnol. Appl. Biochem.—2007.—47, N 4.—P. 205–214.
- Cao M., Cao P., Yan H., Ren F., Lu W., Hu Y., Zhang S. Construction and characterization of an enhanced GFP-tagged anti-BAFF scFv antibody // Appl. Microbiol. Biotechnol.—2008.—79, N 3.—P. 423–431.
- Hobera S., Nordb K., Linhult M. Protein A chromatography for antibody purification // J. Chromatogr. B.—2007.—848, N 1.—P. 40–47.
- Tai M. S., Mudgett-Hunter M., Levinson D., Wu G. M., Haber E., Oppermann H., Huston J. S. A bifunctional fusion protein containing Fc-binding fragment B of staphylococcal protein A amino terminal to antidigoxin single-chain Fv // Biochemistry.—1990.—29, N 35.—P. 8024–8030.
- Gandecha A., Owen M. R., Cockburn W., Whitelam G. C. Antigen detection using recombinant, bifunctional single-chain Fv fusion proteins synthesised in *Escherichia coli* // Protein Exp. Purif.—1994.—5, N 4.—P. 385–390.
- Sambrook J., Fritsch E. F. Molecular cloning: A laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 2001.—999 p.
- Oliinyk O. S., Kaberniuk A. A., Redchuk T. A., Korotkevich N. V., Labyntsev A. U., Romanyuk S. I., Kolibo D. V., Komisarenko S. V. Construction of immune library of murine immunoglobulin genes and screening of single chaine Fv-antibodies to diphtheria toxin B subunit // Ukr. Biochem. J.—2009.—81, N 2.—P. 60–71.
- Schagger H., von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa // Anal. Biochem.—1987.—166.—P. 368–379.
- Kaberniuk A. A., Oliinyk O. S., Redchuk T. A., Romanyuk S. I., Kolibo D. V., Komisarenko S. V. Cloning and expression of diphtheria toxin's recombinant subunits of *Corynebacterium diphtheriae* in *Escherichia coli* // Reports of the Nat. Acad. of Sci. of Ukraine.—2008.—3.—P. 160–166.
- Inouye S., Sahara Y. Soluble protein expression in *E. coli* cells using IgG-binding domain of protein A as a solubilizing partner in the cold induced system // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—2008.—376, N 3.—P. 448–453.
- Verdoliva A., Pannone F., Rossi M., Catello S., Manfredi V. Affinity purification of polyclonal antibodies using a new all-D synthetic peptide ligand: comparison with protein A and protein G // J. Immunol. Meth.—2002.—271, N 1–2.—P. 77–88.

УДК 577.27:616.097
Надійшла до редакції 01.04.09