

ПОЛУЧЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ β 2-МИКРОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА И β 2-МИКРОГЛОБУЛИНА МЫШИ ДЛЯ ЕГО ДЕТЕКТИРОВАНИЯ В ХИМЕРНЫХ МОЛЕКУЛАХ HLA I КЛАССА

В.Н. Каркищенко¹, В.А. Езерский^{2,*}, Е.М. Колоскова², М.С. Нестеров¹

¹ ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

² Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных —
филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»
249013, Российская Федерация, Калужская обл., Боровск, п. Институт

Трансгенные гуманизированные животные всё более востребованы для биомедицинских исследований, фармакологических испытаний. Создается всё больше линий трансгенных животных, в т.ч. и с нокаутом собственных генов. Остро необходима доказательная база интеграции трансгена, его экспрессии, определение состояния нокаута собственного гена на молекулярно-генетическом уровне, детекция трансляции целевого белка в разных органах и тканях, доказательство отсутствия синтеза белка (или его нефункциональность), ген которого был модифицирован. Для этого требуются высокоспецифичные реагенты — в частности, белки и антитела к ним, в подавляющем большинстве своём представленные иностранными производителями. Была поставлена задача идентификации β 2-микроглобулина мыши и человека в белковых фракциях органов и тканей трансгенных и нокаутных мышей нескольких HLA-линий, созданных в последние годы в НЦБМТ ФМБА России. На первом этапе наших исследований были получены штаммы-продуценты *E. coli* рекомбинантных β 2-микроглобулина мыши m β 2mg и β 2-микроглобулина h β 2mg человека. Нуклеотидные последовательности генов были адаптированы для синтеза в бактериальной системе, рекомбинантные белки, m β 2mg и h β 2mg очищены и наработаны в количествах, необходимых для получения аффинных сорбентов и иммунизации животных.

Ключевые слова: штамм-продуцент, рекомбинантный белок, β 2-микроглобулин мыши и β 2-микроглобулин человека

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: государственное задание по теме «Получение новой линии гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген HLA-A*рХ человека и нокаут комплекса H-2K мыши» (шифр: «Транснокаут-2024») ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Для цитирования: Каркищенко В.Н., Езерский В.А., Колоскова Е.М., Нестеров М.С. Получение дифференцированных рекомбинантных белков β 2-микроглобулина человека и β 2-микроглобулина мыши для его детектирования в химерных молекулах HLA I класса. *Биомедицина*. 2024;20(2):21–31. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-21-31>

Поступила 19.03.2024

Принята после доработки 29.04.2024

Опубликована 10.06.2024

PREPARATION OF DIFFERENTIATED RECOMBINANT HUMAN β 2-MICROGLOBULIN AND MOUSE β 2-MICROGLOBULIN PROTEINS FOR ITS DETECTION IN CLASS I HLA CHIMERIC MOLECULES

Nikolay N. Karkischenko¹, Vadim A. Ezerskiy^{2,*}, Elena M. Koloskova², Maxim S. Nesterov¹

¹ Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

²All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition —
Branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute
of Animal Husbandry named after Acad. L.K. Ernst
249013, Russian Federation, Kaluga Region, Borovsk, Institute Village

Transgenic humanized animals are increasingly in demand for biomedical research and pharmacological testing. More and more lines of transgenic animals are being created, including those with knockout of their own genes. There is an urgent need for an evidence base for the integration of a transgene, its expression, determination of the knockout state of its own gene at the molecular genetic level, detection of translation of the target protein in different organs and tissues, proof for the absence of protein synthesis (or its non-functionality), the gene of which has been modified. This requires highly specific reagents, proteins and antibodies to them in particular, the vast majority of which are presented by foreign manufacturers. The task was set to identify mouse and human β 2-microglobulin in protein fractions of organs and tissues of transgenic and knockout mice of several HLA lines created in recent years at the Scientific Center of Biomedical Technologies, Russia. At the first stage of our research, recombinant *E. coli* producing strains were obtained.

Keywords: producer strain, recombinant protein, mouse β 2-microglobulin and human β 2-microglobulin

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: the research topic “Generation of a new line of humanized transgenic mice carrying the human HLA-A* α X gene and knockout of the mouse H-2K complex” (code: “Transknockout-2024”) of state assignment of Scientific Center of Biomedical Technologies of FMBA of Russia.

For citation: Karkischenko V.N., Ezerskiy V.A., Koloskova E.M., Nesterov M.S. Preparation of Differentiated Recombinant Human β 2-Microglobulin and Mouse β 2-Microglobulin Proteins for its Detection in Class I HLA Chimeric Molecules. *Journal Biomed.* 2024;20(2):21–31. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-21-31>

Submitted 19.03.2024

Revised 29.04.2024

Published 10.06.2024

Введение

Получение трансгенных (ТГ) гуманизированных животных с интегрированными генами человека, экспрессирующими человеческие белки, стало неотъемлемой частью биомедицинских исследований, фармакологических испытаний во всем мире [4–6, 13]. Это направление научных исследований в последние годы активно развива-

ется и в России: создается всё больше линий трансгенных животных, в т.ч. и с нокаутом собственных генов [7, 8, 11]. В связи с этим становится остро необходимой доказательная база не только интеграции трансгена, его экспрессии, определение состояния нокаута собственного гена на молекулярно-генетическом уровне, но и детекция трансляции целевого белка в разных органах

и тканях, доказательство отсутствия синтеза белка (или его нефункциональность), ген которого был модифицирован.

В последние годы в НЦБМТ ФМБА России были созданы несколько линий трансгенных мышей с геном *HLA* I класса в той или иной форме: «нативной», «гибридной» (согласно определению, принятым в классической работе Боренштейна [10]), «химерной» [3, 8]. Первые линии наших трансгенных HLA-мышей были получены с использованием простых генетических конструкций: «нативная» генетическая конструкция (ГК) представляла собой непосредственно ген *HLA* I класса — с собственными фланкирующими последовательностями, со всеми экзонами и интронами; в «гибридной» ГК 3'-половина гена (кодирующая $\alpha 3$ -домен, трансмембранную и цитоплазматическую части белка HLA) была заменена соответствующей частью гена *H2* мыши (данные не опубликованы). В стабилизации кодируемого интегрированным трансгеном белка у этих линий мышей участвует эндогенный $\beta 2$ -микроглобулин. К настоящему времени нами получены ТГ мыши, позиционирующие на клеточных мембранах сложные «химерные» белки: к $\alpha 1$ -домену цепи «гибридного» белка гибким линкером «пришит» $\beta 2$ -микроглобулин человека, обеспечивающий дополнительную «человечность» антигенпрезентирующим иммунным механизмам. В виварии НЦБМТ ФМБА России успешно поддерживается линия HLA-A*02:01 [3, 7, 8], с использованием новой ГК HLA-C*07:02 [2] получена новая ТГ линия. У мышей новых линий необходимость присутствия собственного $\beta 2$ -микроглобулина мыши ($m\beta 2mg$) в комплексе с тяжелой химерной цепью обесценилась: место надёжно занято $\beta 2$ -микроглобулином человека ($h\beta 2mg$). Следующий логический шаг в создании HLA трансгенных мышей — обеспечить отсутствие эндогенного $m\beta 2mg$ — нами сделан: получены линии, обладающие вторым признаком — нокаутом гена *m $\beta 2$ mg*

(материалы готовятся к печати). Поскольку $\beta 2$ -микроглобулину принадлежит очень важная роль в стабилизации антигенпрезентирующего комплекса на поверхности клеток, детекция присутствия $h\beta 2mg$ (в составе химерной молекулы), отсутствия синтеза эндогенного $m\beta 2mg$ для нокаутных по этому белку мышей является важным этапом верификации созданных и создаваемых линий.

Практически все высокочувствительные и точные методы обнаружения белков не обходятся без использования антител к ним. Разработано огромное количество тест-систем для обнаружения практически любого белка. Главной проблемой является то, что их подавляющее большинство — иностранного производства за соответственно высокую цену. Например, стоимость ИФА-набора (планшет на 96 лунок) для определения $\beta 2mg$ мыши производства Cloud-Clone Corp. (США) составляет более 80000 руб., аналогичный набор для определения $b2mg$ человека стоит около 60000 руб. (информация сайта <https://белкиантитела.рф/product/SEA260Hu/> на апрель 2024 г.). В этих наборах используются рекомбинантные видоспецифичные $\beta 2mg$ и поликлональные антитела к ним. Стоимость: 1 мг $h\beta 2mg$ — 200000 руб., а поликлональных кроличьих антител к нему — 60000 руб.

Развитие отечественной науки невозможно без создания и развития собственного парка производства реактивов и субстанций для научных и прикладных задач. Разработка рекомбинантных белков (РБ), в т.ч. и с целью получения антител к ним, — одно из направлений комплексного решения научных задач с использованием таких высокочувствительных методов, как вестерн-блот, иммуногистохимия, иммуноцитохимия, иммунопреципитация.

Для идентификации $m\beta 2mg$ и $h\beta 2mg$ в белковых фракциях органов и тканей трансгенных и нокаутных мышей были поставлены следующие задачи:

1. Разработать рекомбинантные плазмиды для экспрессии mβ2mg и hβ2mg в бактериальном штамме-продуcente.

2. Получить штаммы-продуценты, подобрать условия их культивирования и полученных штаммов. Проверить эффективность индукции синтеза рекомбинантных белков mβ2mg и hβ2mg.

3. Подобрать условия очистки и наработать mβ2mg и hβ2mg в количествах, необходимых для иммунизации животных.

Материалы и методы

Плазмида. Синтезированные нуклеотидные последовательности mβ2mg и hβ2mg, оптимизированные по коду для экспрессии в бактериальных системах (табл. 1), были клонированы в плазмиду-вектор pET-28a(+) (ООО «Евроген», Россия).

Штамм *E. coli* BL21 DE3, генотип: fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHIlo ΔEcoRI-B int:: (lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5 (New England Biolabs).

Трансформация. Полученными плазмидами pET-28a(+)/hβ2mg и pET-28a(+)/mβ2mg трансформировали компетентные клетки *E. coli* BL21 (DE3) по методике производителя (New England Biolabs), клетки выращивали на среде LB с агаром (1,5%) и канамицином (60 мкг/мл) при 37°C.

ПЦР. Выросшие клоны проверяли на наличие плазмид методом ПЦР с использованием пар праймеров pET28-f/Humb2-r и pET28-f/Musb2-r, где pET28-f (5'-CCC GCGAAATTAATACGAC-3') — праймер, специфичный к плазмидному вектору, Humb2-r (5'-GACTCAAGGTGAC ATGGTTG-3') и Musb2-r (5'-CAGCCATG CTCGCATGTTTC-3') — праймеры, специфичные к вставке (нуклеотидная последовательность РБ).

Культивирование штаммов-продуцентов. Проверенные ПЦР колонии переносили в 5 мл жидкой среды LB (триптон, 10 г/л; экстракт дрожжей, 5 г/л; NaCl, 10 г/л) с канамицином (60 мкг/мл), инкубировали

в течение ночи при 37°C. По 1 мл ночной культуры вносили в 100 мл LB с антибиотиком, колбы помещали в термощейкер, выращивали в течение нескольких часов. При достижении суспензией оптической плотности (ОП) 0,1–0,6 о.е. (λ_{595}) индуцировали экспрессию РБ добавлением 0,25 М спиртового раствора изопропил-β-D-тиогалактопиранозида (ИПТГ) до 1 мМ. Культивировали еще в течение нескольких часов. После окончания инкубации клетки осаждали центрифугированием, промывали р-ром ФБС, центрифугировали повторно и осадок замораживали до использования.

Очистка РБ. Суспензию центрифугировали. Осадок отбирали для проведения ПААГ электрофореза. Клетки ресуспендировали в лизирующем буфере (50 мМ NaH₂PO₄, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазол, pH=8,0), охлаждали на льду, вносили лизоцим до 1 мг/мл, инкубировали на льду 30 мин, суспензию обрабатывали ультразвуком, после чего центрифугировали при 10000 g, 10°C, 35 мин. Для электрофореза полиакриламидным гелем (ПААГ) отбирали пробу надосадочной жидкости.

Осадок ресуспендировали в буфере C-20 (20 мМ Трис-HCl, 0,5 М NaCl, 8 М мочевины, 20 мМ имидазол, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, pH=7,9), обрабатывали ультразвуком. Центрифугировали при 10000 g, 10°C, 35 мин. В колонку с Ni-сефарозой, уравновешенную буфером C-20, вносили осветленный лизат. Носитель со связанным белком промывали тем же буфером до выхода оптической плотности (ОП) на плато (280 нм). Связанный с носителем РБ снимали буфером C с возрастающим содержанием имидазола 50, 200 и 500 мМ, собирали фракции с различной ОП до ее минимальных значений. На каждом этапе отбирали пробы для оценки качества РБ ПААГ электрофорезом.

Электрофорез (ЭФ) ПЦР-ампlicoнов осуществлялся в 0,8% агарозном геле в TBE (Трис-боратный ЭДТА, 0,5x) буфере. Полосы ДНК визуализовали с помощью

интеркалирующего красителя (бромистого этидия) в трансиллюминаторе при ультрафиолетовом свете (УФ).

Для проведения белкового ЭФ образцы нормализовали по содержанию белка. В зависимости от ОП меньший или больший объём пробы смешивали в соотношении 1:1 с 2х буфером для образцов (БО) (4% додецилсульфата натрия (SDS), 10% 2-меркаптоэтанол, 20% глицерин, 0,125 М Трис-HCl, pH=6,8, бромфеноловый синий 0,1%). Прогревали при 95°C. В лунку концентрирующего геля наносили по 15 мкл подготовленного образца. ЭФ проводили в ПААГ-SDS (12,5% — разделяющий и 4% — концентрирующий гель). Гель окрашивали (0,125% кумасси R250; уксусная кислота 10%; метанол 50%), последовательно отмывали (50% метанол, 10% уксусная кислота и 5% метанол, 7% уксусная кислота) (табл. 3, рис. 2). В качестве маркеров длин ДНК использовалась GeneRuler 1 kb DNA Ladder (“Invitrogen”, США), для оценки размера рекомбинантных белков использовали маркеры молекулярной массы Precision Plus Protein Unstained, 10–250 кДа (“Bio-Rad”, США).

Результаты и их обсуждение

Были получены плазмиды pET-28/ $m\beta$ 2mg и pET-28/ $h\beta$ 2mg для экспрессии РБ $m\beta$ 2mg и $h\beta$ 2mg в бактериальных культурах. Из кДНК эукариотических генов не всегда можно получить ГК, хорошо экспрессирующую в *E. coli*, что обусловлено различной частотой встречаемости тРНК для различных кодирующих триплетов у эукарит и прокариот. Поэтому для экспрессии эукариотических генов в прокариотах создают искусственный ген, в котором аминокислотная последовательность эукариотического белка (например, β 2mg) будет кодироваться триплетами, предпочтительными для экспрессии в *E. coli*. Анализ синтетической последовательности кодонов РБ $m\beta$ 2mg и $h\beta$ 2mg в *E. coli* был выве-

рен в программе Rare Codon Caltor (<http://people.mbi.ucla.edu/sumchan/caltor.html>).

Описание нуклеотидных последовательностей и кодируемых ими РБ приведено в табл. 1. Схема плазмиды pET-28a(+)- $h\beta$ 2mg представлена на рис. 1.

Потенциальные физико-химические свойства РБ были вычислены с использованием программы PROTPARAM (<https://www.protparam.net/index.html>) (табл. 2).

Алифатический индекс белка связан с количеством и качеством гидрофобных аминокислотных (АК) остатков: чем он больше, тем выше термостабильность глобулярных белков. Значение GRAVY связано с гидрофобностью: положительная величина свидетельствует о более высокой гидрофобности [1].

Как следует из табл. 2, рекомбинантные $m\beta$ 2mg и $h\beta$ 2mg имеют некоторую разницу в физико-химических свойствах, обусловленную межвидовыми различиями АК

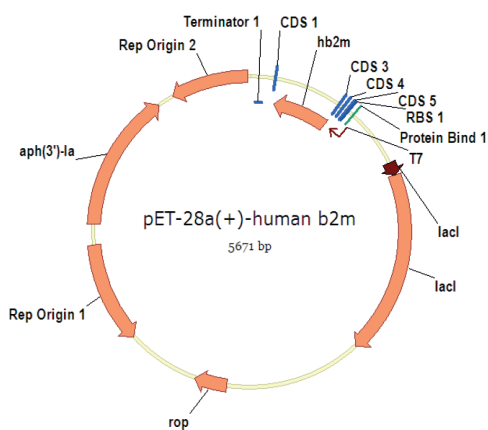


Рис. 1. Плазмида pET-28a (+)/ $h\beta$ 2mg для экспрессии рекомбинантного $h\beta$ 2mg в клетках *E. coli*. Структура плазмиды pET-28a (+)/ $m\beta$ 2mg для экспрессии рекомбинантного $m\beta$ 2mg идентична.

Fig. 1. pET-28a (+)/ $h\beta$ 2mg plasmid for the expression of recombinant $h\beta$ 2mg in *E. coli* cells. The structure of the pET-28a (+)/ $m\beta$ 2mg plasmid for the expression of recombinant $m\beta$ 2mg is identical.

Таблица 1. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности рекомбинантных β2-микроглобулинов мыши и человека

Table 1. Nucleotide and amino acid sequences of recombinant mouse and human β2-microglobulins

Параметр	pET-28/hβ2mg	pET-28/mβ2mg
Клонированная в pET-28a(+) синтетическая оптимизированная нуклеотидная последовательность	CATATGTCACGCAGTGTTCGACCTTGCT GTGCTTGCGTTGTGGAGCTTGAGTGGCT TAGAAGCGATTCAACGCACTCCGAAGAT TCAGGTGTACAGCCGTCATCCTGCTGAGAAT GGCAAGAGCAACTTCTGAACTGCTACGTA AGTGGCTTTCATCCGTCTGACATTGAAGT GGATCTTCTGAAAAATGGTGAACGCATT GAGAAAGTGGAAACATAGTGATCTGAGCTTCTC CAAAGACTGGAGCTTCTATCTcTTGTA CACTGAGTTTCACACCGACTGAGAAAGATGAG TATGCGTGTGCTGTcAACCATGTCACTTGAGT CAACCGAAGATTGTGAAGTGGGATCGTGACAT GCATCACCACCATCATCACTAACCTCGAG	CATATGGCACGCTCTGTGACCTTGGT GTTTCTTGTTGTAGTCAGTCTGACTG GCTTGATGCGATTTCAGAAGACTCCT CAGATTCAAGGTGTACAGTCGT CATCCTCCTGAGAATGGCAAAAC CGAACATTCTGAACTGCTACGTAACCT CAGTTTCATCCTCCTCACATTGAGAT TCAGATGCTGAAGAATGGCAAGAAGA TTCCGAAAGTGGAGATGAGTGACAT GTCCCTTCAGCAAAGACTGGAGCTTC TACATTCTTGCTCATACAGAGTTCACTC CGACTGAGACCGATACCTATGCGTGTC GTGTGAAACATGCCAGCATGGCTGAAC CGAAGACCGTGTAAGTGGGATCGTGACAT GCATCACCACCATCATCACTAACCTCGAG
Аминокислотная последовательность рекомбинантного белка	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMSRSVALAV LALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSN FLNCYVSGFHPDIEVDLLKNGERIEKVEHS DLSFSKDWFSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVN HVTLSQPKIVKWDRDMHHHHHH	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMARSVTLV FLVLVSLTGLYAIQKTPQIQVYSRHP PENGKPNILNCYVTQFHPPIEIQMLK NGKKIPKVEMSDMSFSKDWFSFYLA HTEFTPTETDYACRVKHAASMAEPKTVY WDRDMHHHHHH
Соответствие последовательности белка β2mg базе NCBI	NP_004039.1	NP_033865.2

Примечание: курсивом в нуклеотидной последовательности выделены сайты рестрикции *NdeI* и *XhoI* для клонирования в плазмиду-вектор pET-28a(+); красным — триплет стоп-кодона; жёлтым выделены последовательности, соответствующие β2-микроглобулину; голубым — теги гексагистидина; зелёным — тромбиновый сайт.

Note: the restriction sites *NdeI* and *XhoI* for cloning into the plasmid vector pET-28a(+) are highlighted in italics in the nucleotide sequence; the stop codon triplet is highlighted in red; the sequences corresponding to β2 microglobulin are highlighted in yellow; hexahistidine tags are highlighted in blue; the thrombin site is highlighted in green.

Таблица 2. Физико-химические свойства РБ mβ2mg и hβ2mg

Table 2. Physico-chemical properties of mβ2mg and hβ2mg recombinant proteins

Параметр	hβ2M REC	Mβ2M REC
Aa	145	145
MW	16700.6895	16765.1035
pI	7.06 (7.14)	8.92(8.98)
aliphatic index	75.24	67.17
GRAVY	-0.606	-0.550
Extinction Coefficient	19940	19940
1mg/ml (59.878 uM) solution A280 nm	1.20	1.20

последовательностей β2-микроглобулина. Сравнение АК последовательностей (рис. 2) показывает довольно существенную разницу в АК составе (32% отличия), при этом имеются участки с очень высокой степенью несовпадения (например, фрагмент на С-конце молекулы). Это даёт нам весо-мые основания полагать, что спектры по-ликлональных антител, вырабатываемых

на mβ2mg и hβ2mg, как антигены при им-мунизации животных будут иметь отличия благодаря несовпадающим эпитопам: в ре-зультате технологических манипуляций по-является возможность получения видоспе-цифических антител к β2mg.

Для наработки РБ в качестве штамма-продуцента использовали *E. coli* BL21 (DE3). Штаммы *E. coli* линии В (BL21

NW Score		Identities	Positives	Gaps
449		81/119(68%)	98/119(82%)	0/119(0%)
Query 1		MSRSVALAVLALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLL		60
Sbjct 1		.A...T.VF.V.V...T...Y...K..Q.....P....P.I.....TQ...PH..IQM.		60
Query 61		KNGERIEKVEHSDLSFSKDWFSYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSPQKIVKWDRDM		119
Sbjct 61		...KK.P...M..M.....I.AH.....T.T.....K.ASMAE...T.Y.....		119

Рис. 2. Сравнение АК последовательностей $\text{m}\beta 2\text{mg}$ (sbjct) и $\text{h}\beta 2\text{mg}$ (query). Идентичность — 68%. Точки соответствуют совпадениям, красные буквы — отличия. Сравнения последовательностей выполнены в онлайн-приложении BLAST для нуклеиновых кислот и белков (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).
Fig. 2. Comparison of amino acid sequences of mouse $\beta 2$ -microglobulin (sbjct) and human $\beta 2$ -microglobulin (query). Identity — 68%. The dots correspond to the matches; the red letters are the differences. Sequence comparisons were performed in the BLAST online application for nucleic acids and proteins (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

и др.) не обладают жгутиками, хорошо растут и дают большой выход биомассы клеток. Клетки этой линии лучше усваивают глюкозу из среды, при культивировании образуют меньше уксусной кислоты даже при высокой концентрации глюкозы в среде. Большой выход РБ также обусловлен меньшей деградацией экспрессируемых белков во время выделения и очистки из-за меньшего содержания в бактериях протеолитических ферментов (lon и ompT). *E. coli* BL21 (DE3) имеет интегрированный в хромосому лизоген DE3, λ -профаг, содержащий ген РНК-полимеразы фага T7, обладающей высокой скоростью транскрипции, под контролем промотора lacUV5. Экспрессирующие векторы серии pET содержат T7-промотор, ниже которого находится нуклеотидная последовательность белка. Транскрипция с промотора lac UV5 активируется IPTG (изопропил β -D-1 тиогалактопиранозидом [14, 15].

При работе с несколькими штаммами-продуцентами гомологичных белков возникает необходимость верификации продуцентов. Использование в составе пар праймеров при проведении ПЦР-анализа видоспецифического «белкового» праймера и праймера, специфичного к плазмидному вектору (пары pET28-f/Humb2-г и pET28-f/Musb2-г), позволяет надежно идентифицировать штамм-продуцент: в нашем случае ампликоны размером 482 п.н.

для каждой пары праймеров визуализируются в агарозном геле.

Одна из проблем получения рекомбинантных белков в клетках *E. coli* при интенсивном синтезе — образование нерастворимых телец включения, состоящих из агрегатов РБ и примеси бактериальных белков [9]. С другой стороны, при выделении РБ из телец включения в жестких денатурирующих условиях, например с использованием буферов с высоким содержанием мочевины (до 8 М), белок остается пригодным для иммунизации и получения антител [14]. Напротив, для использования РБ в качестве акцептора на сорбенте для аффинной хроматографии потребуется очистка белка, например диализом. Наличие в РБ полигистидиновой последовательности (6xHis) позволяет производить очистку белка с помощью Ni-сефарозы. Добавление небольшого количества имидазола, конкурента гистидина в связях с никелем, в связывающий и промывочный буферы снижает возможность неспецифического взаимодействия посторонних белков с Ni-сорбентом. Для снятия белка с сорбента используют буфер с возрастающей концентрацией имидазола — до 0,5М.

ПААГ ЭФ белковых образцов показал отсутствие синтеза РБ в неиндуцированной ИПТГ культуре и интенсивную наработку белка после индукции: в белковом

Таблица 3. Образцы для ПААГ электрофореза
Table 3. Samples for PAAG electrophoresis

Дорожка	Образец	Дорожка	Образец
Рекомбинантный тβ2mg		Рекомбинантный hβ2mg	
1	Клон 1 — неиндуцированный	1	Неиндуцированный
2	Клон 1 — после индукции IPTG	2	Лизат осадка тотальный, после центрифугирования
3	Клон 2 — не индуцированный	3	Осадок, растворенный в буфере для нанесения на колонку
4	Клон 2 — после индукции IPTG	4	Разные пики и «хвосты» после снятия с колонки
5	Пик 1 — основной, связавшийся и смытый белок	5	
6–8	Фракции 2–4 (хвосты) пика 1	6–8	
9	Проскок	9	Проскок
10	Маркер молекулярных масс	10	Маркер молекулярных масс

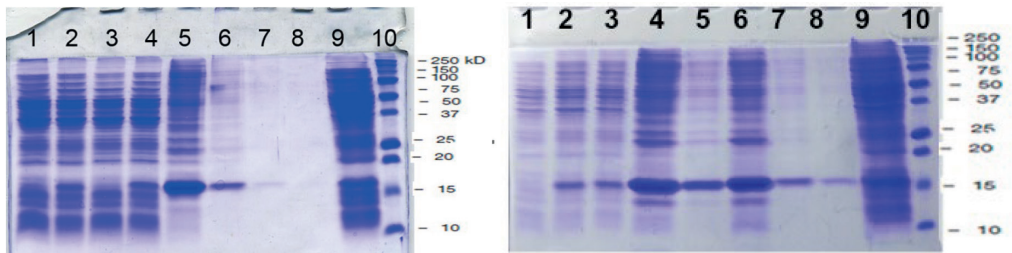


Рис. 3. Результаты ПААГ-электрофореза. 15% ПААГ-SDS. Оценка индукции экспрессии и очистки рекомбинантного тβ2mg (слева). Описание в табл. 3. Стадии наработки и очистки рекомбинантного hβ2mg (справа).
Fig. 3. Results of PAAG electrophoresis. 15% PAAG-SDS. Evaluation of the induction of expression and purification of recombinant тβ2mg (left). Description is given in Table 3. Stages of development and purification of recombinant hβ2mg (right).

ассортименте клеточного лизата хорошо заметна новая полоса размером около 16 кДа, соответствующая рассчитанной молекулярной массе РБ (табл. 3, рис. 3).

Фракции очищенного РБ собирали, концентрацию белка определяли методом Брэдфорд, растворы РБ хранили при +4–8°C до дальнейшего использования.

Заключение

Актуальность создания отечественной базы реактивов и компонентов для аналитических исследований в фундаментальной и прикладной молекулярной биологии, генетике, фармакологии не вызывает сомнений. Особенно остро это касается вери-

фикации функциональности всё большего разнообразия трансгенных гуманизированных животных, в т.ч. и с нокаутом собственных генов. С использованием молекулярно-генетических методов анализа требуется доказать интеграцию трансгена в геном животного, наличие полезных генетических модификаций целевого гена, наличие/отсутствие экспрессии мРНК в органах и тканях животного. В большинстве случаев даже положительные результаты ПЦР-анализа, генетического секвенирования, определение уровня экспрессии не являются окончательным вердиктом пригодности созданной линии трансгенных животных своему предназначению.

Именно подтверждение синтеза человеческих белков в соответствующих органах и тканях трансгенного гуманизированного животного, отсутствие целевого белка нокаутированного гена или, в ряде случаев, доказательство потери его функциональности является обоснованием «профпригодности» новой линии. Как правило, для такого рода исследований требуются методы с приставкой «иммуно»: иммуноферментный анализ, иммуноцитохимия, иммуногистология, иммуноблоттинг во всех его проявлениях.

Нами были созданы несколько линий трансгенных гуманизированных HLA-мышей, функциональность которых требует подтверждения наличия $\beta 2$ -микроглобулина человека в составе химерного белка (продукта синтеза трансгена — тяжелая монопептид, состоящая из цитоплазматической, трансмембранной части, $\alpha 3$ -домена мышиного H2, антигенпрезентирующих $\alpha 2$ - и $\alpha 1$ -доменов белка HLA, и $\beta 2$ -микроглобулина человека, гибкой цепью «пришитого» к $\alpha 1$). Это мыши линии HLA-A*02:01 [3, 7, 8], подтверждённой уже в нескольких поколениях, мыши новой создаваемой линии HLA-C*07:02 [2], ожидающей верификации, а также на их основе — линии с двумя генетическими признаками: HLA-трансген и нокаут $\beta 2$ -микроглобулина. Как у полученных мышей с одним только признаком трансгенности HLA/B2m^{+/+}, так и у мышей с двумя признаками HLA/B2m^{-/-} наличие/отсутствие $\beta 2$ -микро-

глобулина человека и мыши придётся подтверждать не только молекулярно-генетическими, но и специфическими методами вариаций иммунного анализа. Анализ коммерческих предложений импортного происхождения убедил нас в необходимости и возможности получения собственных компонентов для создания иммунологических методов исследования — гомологичных рекомбинантных белков и поликлональных антител к ним. Биоинформационный анализ аминокислотных последовательностей m $\beta 2$ mg и h $\beta 2$ mg с использованием онлайн-приложений позволил предположить возможность получения видоспецифичных антител, обладающих минимальной перекрёстной реакцией при применении продуманных методов очистки поликлональных антител.

На первом, исходном этапе наших исследований в новом направлении — использовании собственных возможностей участия в создании насыщенно необходимой и независимой отечественной базы реагентов для тонких биологических, иммунохимических, фармакологических исследований — были получены штаммы-продуценты *E. coli* рекомбинантных $\beta 2$ -микроглобулина мыши и человека. Нуклеотидные последовательности генов были адаптированы для синтеза в бактериальной системе, рекомбинантные белки — m $\beta 2$ mg и h $\beta 2$ mg — очищены и наработаны в количествах, необходимых для получения аффинных сорбентов и иммунизации животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Богомолова Т.Г., Добровольская О.А., Миротская А.А., Аль-Шехадат Р.И., Федорова Е.А., Духовлинов И.В., Симбирцев А.С. Разработка кандидатной субстанции рекомбинантного белка CRM197. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016;15(1):93–98. [Bogomolova E.G., Dobrovolskaya O.A., Mirovskaya A.A., Al-Shehadat R.I., Fedorova E.A., Dukhovlinov I.V., Simbirtsev A.S. Razrabotka kandidatnoj substancii rekombinantnogo belka CRM197 [Development of pharmacology grade substance of recombinant protein CRM197]. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika* [Epidemiology and vaccinal prevention]. 2016;15(1):93–98. DOI: 10.31631/2073-3046-2016-15-1-93-98.
2. Каркищенко Н.Н., Лазарев В.Н., Манувер В.А., Бобровский П.А., Петрова Н.В., Колоскова Е.М., Глотова Е.С. Принципы создания генно-инженерной конструкции для получения гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген HLA-C*07:02:01:01, как прообраз инновационных

- трансгенно-нокаутных биомodelей. *Биомедицина*. 2024;20(1):8–20. [Karkischenko N.N., Lazarev V.N., Manuvera V.A., Bobrovsky P.A., Petrova N.V., Koloskova E.M., Glotova E.S. Principy sozdaniya genno-inzhenernoj konstrukcii dlya polucheniya gumanizirovannykh transgennykh myshey, nesushchikh gen *HLA-C*07:02:01:01*, kak probraz innovatsionnykh transgenno-nokautnykh biomodelей [Principles of Creation of a Genetic Engineering Construction for Obtaining Humanized Transgenic Mice with *HLA-C*07:02:01:01*, as a Promote of Innovative Transgenic and Knockout Biomodels]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2024;20(1):8–20. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-20-1-8-20.
3. Каркищенко В.Н., Петрова Н.В., Савченко Е.С., Огнева Н.С., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Манувера В.А., Бобровский П.А., Лазарев В.Н. Создание полных гибридных ДНК-конструкций с геном человека *HLA-A*02:01:01:01*. *Биомедицина*. 2021;17(1):10–23. [Karkischenko V.N., Petrova N.V., Savchenko E.S., Ogneva N.S., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Manuvera V.A., Bobrovsky P.A., Lazarev V.N. Sozdanie polnih gibritnih DNK-konstrukcij s genom cheloveka *HLA-A*02:01:01:01* [Chimeric Construct Engineering with Human Variant *HLA-A*02:01:01:01*]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2021;17(1):10–23. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-17-1-10-23.
4. Каркищенко Н.Н., Рябых В.П., Каркищенко В.Н., Колоскова Е.М. Создание гуманизированных мышей для фармакотоксикологических исследований (успехи, неудачи и перспективы). *Биомедицина*. 2014;1(3):4–22. [Karkischenko N.N., Ryabykh V.P., Karkischenko V.N., Koloskova E.M. Sozdanie gumanizirovannykh myshey dlya farmakotoksikologicheskikh issledovaniy (uspekhi, neudachi i perspektivy) [Creation of humanized mice for pharmacotoxicological research (successes, failures and prospects)]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2014;1(3):4–22. (In Russian)].
5. Каркищенко В.Н., Рябых В.П., Каркищенко Н.Н., Дуля М.С., Езерский В.А., Колоскова Е.М., Лазарев В.Н., Максименко С.В., Петрова Н.В., Столярова В.Н., Трубицына Т.П. Молекулярно-генетические аспекты технологии получения трансгенных мышей с интегрированными генами N-ацетилтрансферазы (*NAT1* и *NAT2*) человека. *Биомедицина*. 2016;1:4–17. [Karkischenko V.N., Ryabykh V.P., Karkischenko N.N., Dulya M.S., Ezerskiy V.A., Koloskova E.M., Lazarev V.N., Maksimenko S.V., Petrova N.V., Stolyarova V.N., Trubitsyna T.P. Molekulyarno-geneticheskie aspekty tekhnologii polucheniya transgennykh myshey s integrirovannymi genami N-atsetiltransferazy (*NAT1* i *NAT2*) cheloveka [Molecular and genetic aspects of the technology for producing transgenic mice with integrated genes of human N-acetyltransferase (*NAT1* and *NAT2*)]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2016;1:4–17. (In Russian)].
6. Кит О.И., Максимов А.Ю., Протасова Т.П., Гончарова А.С., Кутилин Д.С., Лукбанова Е.А. Гумани-зированные мыши: методы получения, модели и использование в экспериментальной онкологии (обзор). *Биомедицина*. 2019;15(4):67–81. [Kit O.I., Maksimov A.Yu., Protasova T.P., Goncharova A.S., Kutilin D.S., Lukbanova E.A. Gumanizirovannye myshi: metody polucheniya, modeli i ispol'zovanie v eksperimental'noy onkologii (obzor) [Humanized Mice: Creation, Models and Use in Experimental Oncology (Review)]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2019;15(4):67–81. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-15-4-67-81.
7. Петрова Н.В., Скрипкина М.М. Особенности организации содержания и выведения трансгенных линий мышей в НЦБМТ ФМБА России. *Биомедицина*. 2021;17(3Е):70–75. [Petrova N.V., Skripkina M.M. Osobennosti organizatsii soderzhaniya i vyvedeniya transgennykh linij myshey v NCzBMT FMBA Rossii [Maintenance and Breeding of Transgenic Mouse Strains at the Scientific Center of Biomedical Technologies of the FMBA of Russia]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2021;17(3Е):70–75. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2713-0428-17-3Е-70-75.
8. Савченко Е.С., Огнева Н.С., Каркищенко Н.Н. Эмбриологические аспекты создания новой гуманизированной трансгенной линии мышей с интегрированным геном человека *HLA-A*02:01:01:01*. *Биомедицина*. 2022;18(4):10–23. [Savchenko E.S., Ogneva N.S., Karkischenko N.N. Embriologicheskie aspekty sozdaniya novej gumanizirovannoy transgennoj linii myshey s integrirovannym genom cheloveka *HLA-A*02:01:01:01* [Embryological Aspects of Creation of a New Humanized Transgenic Mice with Integrated Human *HLA-A*02:01:01:01* Gene]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2022;18(4):10–23. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-18-4-10-23.
9. Baneyx F., Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 2004;22:1399–1408.
10. Borenstein S.H., Graham J., Zhang X.L., Chamberlain J.W. CD⁸⁺ T cells are necessary for recognition of allelic, but not locus-mismatched or xeno-, HLA class I transplantation antigens. *J. Immunol.* 2000;165(5):2341–2353. DOI: 10.4049/jimmunol.165.5.2341.
11. Korablev A., Lukyanchikova V., Serova I., Battulin N. On-Target CRISPR/Cas9 Activity Can Cause Undesigned Large Deletion in Mouse Zygotes. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21:3604. DOI: 10.3390/ijms21103604.
12. Makrides S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 1996;60(3):512–538. DOI: 10.1128/mr.60.3.512–538.1996.
13. Masemann D., Ludwig S., Boergeling Y. Advances in Transgenic Mouse Models to Study Infections by Human Pathogenic Viruses. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(23):9289. DOI: 10.3390/ijms21239289.
14. Rosano G.L., Ceccarelli E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and chal-

lenges. *Front Microbiol.* 2014;5:172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172.

15. Studier F.W., Moffatt B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level

expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology.* 1986;189(1):113–130. DOI: 10.1016/0022-2836(86)90385-2.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н., проф., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Езерский Вадим Аркадьевич*, Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста»;
e-mail: ez.vadim@yandex.ru

Vadim A. Ezerskiy*, All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — Branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Acad. L.K. Ernst;
e-mail: ez.vadim@yandex.ru

Колоскова Елена Михайловна, к.б.н., Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста»;
e-mail: heleko3@yandex.ru

Elena M. Koloskova, Cand. Sci. (Biol.), All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — Branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Acad. L.K. Ernst;
e-mail: heleko3@yandex.ru

Нестеров Максим Сергеевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: mdulya@gmail.com

Maxim S. Nesterov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: mdulya@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author