

ISSN 1818-7943



Вестник

ЖГУ

Научный журнал
Основан в ноябре 1999 года

Том 11
Выпуск 3
2013

Серия: Биология, клиническая медицина

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ВЕСТНИК НОВОСИБИРСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

Серия: Биология, клиническая медицина. 2013. Т. 11, вып. 3

Периодичность – 4 раза в год
Выходит на русском языке

Индекс в каталоге Роспечати 18281

В 2009 г. НГУ присвоена категория
«национальный исследовательский
университет»

Журнал включен в Перечень
ведущих рецензируемых научных изданий
и журналов, рекомендуемых Высшей
аттестационной комиссией
для публикации основных научных
результатов диссертаций
на соискание ученой степени
кандидата и доктора наук

Журнал включен в Реферативный журнал
и Базы данных ВИНТИ,
а также в российский индекс научного
цитирования



Электронная версия журнала
размещена на платформе
Научной электронной
библиотеки: www.elibrary.ru

Редактор К. В. Шмугурова
Оригинал-макет И. А. Похорокуовой

Журнал зарегистрирован в ФС по надзору
в сфере связи, информационных технологий
и массовых коммуникаций
(свидетельство ПИ № ФС77-40141 от 04.06.2010)

Сдано в набор 20.06.2013
Подписано в печать 13.09.2013
Бумага офсетная № 1. Формат 60×84/8
Гарнитура Times New Roman
Печать офсетная
Усл. печ. л. 29,75. Уч.-изд. л. 27,7
Тираж 1000 экз. Заказ № 223

Редакционно-издательский центр НГУ
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090
Россия

© Новосибирский государственный
университет, 2013

Редакционная коллегия серии

Главный редактор
д-р мед. наук, проф. А. Г. Покровский
Заместитель главного редактора
д-р мед. наук, проф. М. Ю. Денисов
Ответственный секретарь
д-р мед. наук, проф. Г. И. Лифшиц

Члены редакционного совета
акад. РАН В. В. Власов
акад. РАН Л. Н. Иванова
акад. РАМН В. И. Коненков
акад. РАМН В. В. Ляхович
акад. РАМН Ю. П. Никитин
акад. РАН Г. А. Толстиков
д-р биол. наук, проф. Л. Ф. Гуляева
д-р мед. наук, проф. С. Д. Никонов
д-р мед. наук, проф. Н. М. Пасман
д-р мед. наук, проф. М. А. Садовой
д-р мед. наук, проф. С. В. Сидоров
д-р мед. наук, проф. Г. С. Солдатова
д-р мед. наук, проф. В. В. Степанов

Адрес редколлегии:

ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия
Телефон/факс: (383) 363 42 10
E-mail: medik@vestnik.nsu.ru

Редакционный совет журнала

Председатель
д-р физ.-мат. наук, проф. М. П. Федорук
Заместители председателя
чл.-корр. РАН С. В. Нетёсов
канд. социол. наук, доц. С. Г. Саблина
д-р физ.-мат. наук, проф. М. М. Лаврентьев

акад. РАН В. И. Молодин
чл.-корр. РАН С. С. Гончаров
чл.-корр. РАН А. М. Федотов
акад. РАО А. А. Никитин
д-р физ.-мат. наук, проф. А. В. Аржанников
д-р филос. наук, проф. В. С. Диев
д-р юрид. наук, проф. В. С. Курчеев
д-р экон. наук, проф. Г. М. Мкртчян
канд. психол. наук О. Н. Первушина
д-р мед. наук, проф. А. Г. Покровский
д-р филол. наук, проф. И. В. Шапошникова

ВЕСТНИК

НОВОСИБИРСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

Научный журнал
Основан в ноябре 1999 года

Серия: Биология, клиническая медицина

2013. Том 11, выпуск 3

СОДЕРЖАНИЕ

Оригинальные исследования

<i>Бондаренко А. В.</i> Методология исследований населения дневных бабочек Алтае-Саянской горной страны	5
<i>Бондаренко А. В.</i> Пространственно-типологическая структура населения булавоусых чешуекрылых Алтае-Саянского экорегиона. I. Классификация видов и типов населения	15
<i>Бондаренко А. В.</i> Пространственно-типологическая структура населения булавоусых чешуекрылых Алтае-Саянского экорегиона. II. Организация и факторы среды	23
<i>Сергеев М. Г., Молодцов В. В., Ванькова И. А., Батурина Н. С., Бывальцев А. М., Ефремова О. В.</i> Специфика населения саранчовых (Insecta: Orthoptera: Acridoidea) в районах массовых размножений итальянского пруса (<i>Calliptamus Italicus</i> L.) на юго-востоке Западно-Сибирской равнины	35
<i>Сергеев М. Г.</i> Население прямокрылых насекомых (Orthoptera) предальтайских увалов	44
<i>Высочина Г. И., Кукушкина Т. А., Васфилова Е. С.</i> Биологически активные вещества растений рода <i>Filipendula</i> Mill. на Среднем Урале	50
<i>Байков И. К., Хлусевич Я. А., Матвеев А. Л., Бабкина И. Н., Тихунова Н. В.</i> Конструирование кассетных векторных плазмид для получения полноразмерных рекомбинантных антигенов	56
<i>Аликина Т. Ю., Тупикин А. Е., Бондарь А. А., Кабилов М. Р.</i> Особенности амплификации гена 16S рРНК микробиома кишечника человека	65
<i>Святченко В. А., Терновой В. А., Киселев Н. Н., Тарасова М. В., Локтев В. Б., Чумаков П. М., Нетёсов С. В.</i> Конструирование перспективного онколитического вируса AD2DEL на основе генома аденовируса 2-го серотипа	70
<i>Абдуллаянова Э. Р., Зайковская А. В., Шерстков Е. А., Шестопалов А. М., Виноградова М. С., Шестопалова Л. В.</i> Изменение клеточного состава периферической крови у диких уток при экспериментальной гриппозной инфекции	78
<i>Прокопьева Е. А., Глуценко А. В., Шестопалов А. М., Шестопалова Л. В.</i> Особенности влияния пандемического вируса гриппа А / H1N1 на клетки головного мозга лабораторных мышей	84
<i>Жураковский И. П., Архипов С. А., Кунц Т. А., Пустоветова М. Г., Маринкин И. О.</i> Световой десинхронизм индуцирует апоптоз фибробластов кожи при стафилококковой инфекции	91
<i>Сабирова Р. А., Касимова Г. З.</i> Роль факторов системы оксида азота в динамике формирования у экспериментальных животных метаболического синдрома	96
<i>Жураковский И. П., Айдагулова С. В., Ищенко И. Ю., Пустоветова М. Г.</i> Морфология межпозвонковых дисков при моделировании стафилококковой инфекции	102
<i>Кузьмин А. Г., Сепп А. В., Мельникова С. Л.</i> Экспрессия трансформирующего фактора роста $\beta 1$ и матриксных металлопротеиназ при дезадаптивном ремоделировании сердца	109

<i>Чернявский А. М., Ефанова О. С., Эфендиев В. У., Сирота Д. А., Аляпкина Е. М.</i> Качество жизни больных с левожелудочковой недостаточностью при медикаментозной терапии	117
<i>Гаус О. В., Ахмедов В. А.</i> Клинико-биохимические и иммунологические особенности желчнокаменной болезни, ассоциированной с метаболическим синдромом	125
<i>Совалкин В. И., Смирнова Л. М., Бикбаева Г. Р., Лабузина Н. С., Третьякова Т. В., Михалева Л. В.</i> Дифференциально-диагностические критерии болезни Крона и язвенного колита	130
<i>Чупрынова М. Ю., Потрохова Е. А., Романова М. А.</i> Механизмы развития эксхеликобактерного гастрита у подростков	136
<i>Латышев Д. Ю., Данилов А. Н., Печкина К. Г., Лобанов Ю. Ф., Данилов Д. А.</i> К вопросу о показателях обмена железа у детей с хеликобактерным гастритом	142
<i>Соловьев А. В.</i> Осложнения катетеризации подключичной вены как причина выбора сосудистого доступа у детей	147
<i>Мыщик А. В., Акулинин В. А., Степанов С. С., Ларионов П. М.</i> Иммуногистохимическая и морфометрическая характеристика межнейронных взаимоотношений лобной коры большого мозга человека при острой и хронической ишемии	154
<i>Сапронова М. Р., Шнайдер Н. А., Похабов Д. В., Трикман О. П., Касперович Н. А., Ломакин А. И.</i> Социально-демографическая характеристика болезни Паркинсона на территории закрытого административного территориального образования	161
<i>Маслова Н. Н., Андреева Е. А.</i> Эпидемиология рассеянного склероза в Калужской области	168
<i>Исакова Н. Б., Старкова Е. В.</i> Тазовые лимфатические узлы при моделировании рака прямой кишки и в условиях фитокоррекции	174
<i>Трунов А. Н., Кулешов В. М., Сафронов И. Д., Горбенко О. М., Шваюк А. П., Обухова О. О., Ваулин Д. Е., Анисимова Н. И., Трунова Л. А.</i> Иммунобиохимические изменения в перитонеальной жидкости женщин с бесплодием	182

Обзоры

<i>Малиновская Н. А., Салмина А. Б., Моргун А. В., Комлева Ю. К., Шилина Е. В., Кувачева Н. В., Фролова О. В.</i> Молекулы-мишени при болезни Паркинсона	187
<i>Ложкина Н. Г., Куимов А. Д., Рагино Ю. И., Воевода М. И.</i> Воспалительные маркеры и острый коронарный синдром	199
<i>Фуголь Д. С., Лобанов Ю. Ф., Тен Ю. В., Кислова Т. Б.</i> Тошнота и рвота у детей: сложности дифференциальной диагностики	205
<i>Севостьянова К. С., Шевела А. И., Новикова Я. В., Тулупов А. А.</i> Возможности магнитно-резонансной томографии в диагностике венозной патологии	212

Высшая школа

<i>Денисов М. Ю., Покровский А. Г., Сергеева И. Г., Пустыльняк В. О., Тулупов А. А., Гуляева Л. Ф., Субботин Д. В.</i> Особенности научно-образовательной системы Калифорнийского университета	220
--	-----

Юбилей

Михаил Юрьевич Денисов (к 50-летию со дня рождения)	226
Сведения об авторах	228
Информация для авторов	235

И. К. Байков, Я. А. Хлусевич, А. Л. Матвеев, И. Н. Бабкина, Н. В. Тикунова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
пр. Акад. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия

E-mail: ivan_baykov@mail.ru

КОНСТРУИРОВАНИЕ КАССЕТНЫХ ВЕКТОРНЫХ ПЛАЗМИД ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛНОРАЗМЕРНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ

Сконструированы оригинальные кассетные векторные плазмиды pCH2g и pCL2h, предназначенные для клонирования V-генов, кодирующих переменные домены тяжелых и легких цепей антител, и продукции рекомбинантных полноразмерных антител в эукариотических клетках. На основе этих ДНК созданы плазмиды pCH2g-1B1 и pCL2h-1B1a, а также pCH2g-1A и pCL2h-1A, обеспечившие в клетках CHO-K1 продукцию химерного антитела ch1B1a против белка E вируса клещевого энцефалита и полноразмерного человеческого антитела fh1A против иммунодоминантного белка p35 ортопоксвирусов. Структура рекомбинантных антител подтверждена электрофоретически и масс-спектрометрически. Иммуноферментным анализом и с помощью оптического биосенсора ProteOn XPR36 подтверждена способность полученных антител специфически связывать целевой антиген; изменены равновесные константы аффинности этих антител.

Ключевые слова: плазида, клонирование, химерное антитело, полностью человеческое антитело.

Антитела и их производные широко используются в различных областях биологии и медицины. На основе иммуноглобулинов создают терапевтические препараты и тест-системы для диагностики заболеваний [1]. Антитела, конъюгированные с красителями или ферментативными метками, являются ключевым компонентом иммуногистохимических и цитофлуориметрических исследований [2]. Высокая востребованность антител для современной биотехнологии подтверждается экспоненциальным ростом рынка таких препаратов [3; 4].

Рекомбинантные антитела получают в различных системах экспрессии, большая часть которых основана на клетках млекопитающих преимущественно линии CHO [5]. Эти клетки обеспечивают приемлемый уровень продукции белка, родственное человеческому организму гликозилирование тяжелых цепей антител, они аттестованы в Российской Федерации для наработки в них лекарственных препаратов. Ранее для получения полноразмерных антител нами использована система транзientной экспрессии на основе клеток линии НЕК293Т и

плазмид pCH1 и pCL1, обеспечивающих синтез тяжелой и легкой цепей полноразмерного человеческого антитела против вируса Эбола [6]. Однако эти плазмиды несут один и тот же ген устойчивости к генетицину, что затрудняет отбор клонов при создании клеточной линии, стабильно секретирующей антитело. Кроме того, эти плазмиды не содержат сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции, обеспечивающие замену V-генов с целью получения антител другой специфичности.

Для получения клеточных линий, стабильно продуцирующих различные полноразмерные антитела, необходимо было заменить ген устойчивости к антибиотику в одной из плазмид. Также в плазмиды следовало ввести уникальные сайты гидролиза эндонуклеазами рестрикции для встраивания различных фрагментов, кодирующих переменные домены тяжелых (V_H) и легких (V_L) цепей антител. С использованием сконструированных плазмид предполагалось получить химерное антитело против гликопротеина E вируса клещевого энцефалита и полноразмерное человеческое анти-

тело против иммунодоминантного белка р35 ортопоксвирусов, а также подтвердить их специфичность.

Цель исследования – провести конструирование кассетных векторных плазмид для получения полноразмерных рекомбинантных антител в эукариотических клетках.

Материал и методы

В работе использовали бактериальный штамм *E. coli* XL1-blue, линию эукариотических клеток CHO-K1.

Выделение РНК и синтез кДНК осуществляли с использованием наборов RNeasy kit («QIAGEN») и One-step RT-PCR kit («QIAGEN») согласно инструкции производителя. В реакции применяли следующие олигонуклеотиды:

mouse_IgHG1_const_rev: 5'-GGCAAGCTTATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC;

MH1_dir: 5'-CTTCCGGAATTC SARGTNMAGCTGSAGSAGTC;

mus_kappa_dir: 5'-CCGAATTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA;

mus_kappa_const_rev: 5'-GGGAAGCTTGATACAGTTGGTGCAGCATCAGC.

Определение нуклеотидных последовательностей фрагментов. Реакцию Сэнгера проводили с использованием набора BigDye Terminator 3.1 cycle sequencing kit («Applied Biosystems»). Продукты реакции очищали от невключившейся метки с помощью гель-фильтрации на колонках с сорбентом Sephadex G50 («GE Healthcare»), после чего образцы передавали в Центр коллективного пользования «Геномика» СО РАН для анализа на секвенаторе ABI 3130xl.

Сайт-направленный мутагенез векторных плазмид с целью введения сайтов гидролиза эндонуклеазами рестрикции проводили с помощью метода мегапраймера [7; 8]. В качестве праймерных олигонуклеотидов, вносящих мутации, использовали следующие олигонуклеотиды (подчеркнуты нуклеотиды, содержащие сайты гидролиза эндонуклеазами рестрикции):

VH_dir_XhoI: 5'-GAGGTGCAGCTGCTCGAGTCTGG;

VH_rev_Acc65I: 5'-GACGGTGACCAGGGTACCCTGGCC;

VL_dir_EcoRV: 5'-GGGATATCGTGATGACCCAGTCCCC;

VL_rev_HindIII: 5'-CCGTTTGATCTCAAGCTTGGTCCC.

Для амплификации фрагментов, в которые вносили мутации, применяли фланкирующие праймерные олигонуклеотиды T7mod_dir: 5'-GGCTTATCGAAATTAATACG и BGH_rev: 5'-TAGAAGGCACAGTCCGAGG. Для получения олигонуклеотидного двуцепочечного коннектора для плазмиды pCH2g 10 мкл реакционной смеси, содержащей по 250 нг олигонуклеотидов pCHm2_adapter_dir: 5'-TCGAGGTCGACAGCGGCCGCG и pCHm2_adapter_rev: 5'-GTACCGCGGCCGCTGTCGACC, 1 ед. акт. полинуклеотидкиназы бактериофага T4, а также 1 мкл буфера «10× T4 ligase buffer» («Fermentas»), инкубировали 1 ч при 37 °С, затем 3 мин при 80 °С, после чего медленно охладили до 25 °С. Аналогично на основе олигонуклеотидов pCLm4_adapter_dir: 5'-ATCGTCGACAGCGGCCGCA и pCLm4_adapter_rev: 5'-AGCTTGC GGCCGCTGTCGACGAT получен коннектор для плазмиды pCL2h.

Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК проводили согласно стандартной методике с использованием 6 % полиакриламидного геля либо 1 % агарозного геля в буфере, содержащем 40 мМ Трис, 20 мМ уксусную кислоту и 1 мМ этилендиаминтетрауксусную кислоту. Для визуализации ДНК гель окрашивали раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл). В качестве маркера молекулярных масс использовали 100 bp DNA Ladder («Fermentas»).

Электрофоретическое разделение белков проводили по Лэммли [9]. Гели окрашивали спиртовым раствором красителя Coomassie Brilliant Blue R-250 («Sigma»).

Антитела в эукариотических клетках получали в результате транзientной экспрессии в клетках линии CHO-K1. Плазмидную ДНК для трансфекции клеток нарабатывали в клетках *E. coli* XL1-blue и выделяли с использованием набора PureYield plasmid midiprep system («Promega») согласно рекомендациям производителя. Эукариотические клетки трансфицировали с помощью реагента Lipofectamine 2000 («Invitrogen») в соответствии с рекомендациями производителя. Трансфекцию проводили одновременно двумя плазмидными ДНК, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела. В качестве контроля трансфекции использовали плазмидную ДНК pEGFP-N1 («Clontech»), кодирующую зеленый флуо-

ресцентный белок. После трансфекции клетки культивировали в среде Ham's F12 Nutrient Mixture («Gibco») с 2 % бычьей эмбриональной сывороткой с пониженным содержанием иммуноглобулинов. Отбор и замену культуральной среды осуществляли один раз в сутки на протяжении 5–7 дней.

Хроматографическое выделение антител. Культуральную среду, содержащую рекомбинантное антитело, центрифугировали 10 мин при 12 000g. Хроматографическую полипропиленовую колонку («QIAGEN»), содержащую белок А-сефарозу CL-4B («GE Healthcare»), предварительно уравнивали фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБР) в составе: 100 мМ NaCl, 50 мМ Na₂HPO₄ при pH 7,4. Супернатант наносили на колонку со скоростью 0,5 мл/мин при температуре 4 °С. Колонку промывали тремя объемами ФСБР, затем отмывали от иммуноглобулинов быка четырьмя объемами 0,1 М цитратного буфера, pH 5,0, и элюировали рекомбинантное антитело четырьмя объемами 0,1 М цитратного буфера, pH 3,0. К элюату добавляли 1 М трис-НСl буфер, pH 8,8, в соотношении 1 : 10 для изменения pH до физиологических значений. Раствор антитела концентрировали с помощью фильтров Amicon Ultra-4 30K («Millipore») и заменяли буфер на ФСБР с добавлением 0,05 % азида натрия. Концентрацию белка в препарате определяли спектрофотометрически на длине волны 280 нм.

Гидролиз белков трипсином и масс-спектрометрический анализ пептидов. Препараты антител разделяли электрофоретически в полиакриламидном геле, после чего вырезали участки геля, содержащие легкие и тяжелые цепи. Для удаления красителя к измельченному гелю добавляли 50–100 мкл 50 мМ NH₄HCO₃ в 50 % водном растворе ацетонитрила, взбалтывали в течение 10 мин, после чего супернатант удаляли и добавляли 50–100 мкл 100 % ацетонитрила. Через 2 мин ацетонитрил также удаляли, процедуру отмывки повторяли два раза. После высушивания в вакуумном концентраторе к образцам добавляли 30 мкл раствора модифицированного трипсина («Promega») 20 нг/мкл в 50 мМ NH₄HCO₃. Образцы инкубировали 1 ч при 4 °С, затем в течение ночи при 37 °С. Образовавшиеся пептиды экстрагировали 25 мкл 25 мМ раствора NH₄HCO₃ и упаривали в вакуумном концентраторе до 10 мкл. Пептиды дополнительно очищали с

помощью наконечников ZipTip C18 («Millipore») согласно инструкции производителя. Образцы полностью высушивали и передавали для анализа на масс-спектрометре UltraFlex II («Bruker Daltonics»). Полученные спектры обрабатывали с помощью программы mMass.

Иммуноферментный анализ. В лунки 96-луночных полистирольных иммунологических планшетов («Медполимер») сорбировали по 100 нг белка р35d либо контрольный антиген (3 % раствор бычьего сывороточного альбумина), растворенные в ФСБР, pH 7,4. После блокировки мест неспецифического связывания ФСБР с 0,2 % Твин-20 лунки инкубировали 1 ч при 37 °С с полноразмерным антителом человека fh1A в соответствующих разведениях. Иммуные комплексы, образовавшиеся в ходе реакции, выявляли инкубацией с раствором мышинового моноклонального антитела против Fc-фрагментов IgG1 антител человека, конъюгированного с щелочной фосфатазой («Sigma»). Конъюгат использовали в разведении 1 : 12 000 в ФСБР с 0,05 % Твин-20. После инкубации в течение часа при 37 °С лунки трехкратно промывали ФСБР с 0,05 % Твин-20, затем трехкратно AP-буфером (100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 100 мМ трис-НСl, pH 9,5) и добавляли в лунки 100 мкл 2 мг/мл раствора паранитрофенилфосфата в AP-буфере. Оптическую плотность раствора в лунках измеряли на планшетном спектрофотометре Model 680 microplate reader («Bio-Rad») при длине волны 405 нм.

Анализ связывания антител с антигенами на оптическом биосенсоре. Рекомбинантный белок E [10] ковалентно иммобилизовали на поверхность GLC-чипа. Для этого использовали 10 мкг/мл раствора белка в 10 мМ ацетате натрия, pH 4,5. Уровень иммобилизации составил 4 000 RU. Растворы антитела в фосфатно-солевом буферном растворе с добавлением 0,005 % Твин-20 (ФСБР-Т), полученные в результате последовательного двукратного разведения, начиная с концентрации 50 нМ, пропускали над поверхностью чипа. Ассоциация длилась 600 с при скорости потока 25 мкл/мин, диссоциация протекала 4 ч в ФСБР-Т при той же скорости потока. Константы скорости ассоциации и диссоциации, а также равновесная константа диссоциации были определены в режиме объединенного анализа согласно модели Лэнгмюра с использованием про-

граммного обеспечения ProteOn Manager software 3.1.0.

Результаты исследования и обсуждение

Конструирование кассетных векторных плазмид. Для получения полноразмерных рекомбинантных антител преимущественно используют клетки млекопитающих, трансфицированные плазмидными ДНК, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела [11]. При получении линии клеток, стабильно секретирующих антитело, необходимо проводить отбор клонов, содержащих одновременно плазмиды, несущие гены тяжелой и легкой цепей антитела, что обеспечивается применением плазмид, несущих гены устойчивости к разным антибиотикам. Ранее в нашей лаборатории для транзientной экспрессии генов антител использовали клетки линий НЕК293Т или CHO-K1, а также плазмиды рСН1 и рСL1 [6], содержащие гены тяжелой и легкой цепей полноразмерного человеческого антитела против вируса Эбола. Эти плазмиды сконструированы на основе коммерческого вектора рсDNA3.1(+) («Invitrogen»), гены тяжелой и легкой цепей в них находятся под контролем цитомегаловирусного промотора и содержат последовательности полиаденилирования гена бычьего гормона роста. Обе плазмиды содержат ген устойчивости к генетицину в качестве селективного маркера.

Для замены в плазмиде рСL1 гена устойчивости к генетицину эту плазмиду гидролизировали эндонуклеазами рестрикции *NheI* и *ApaI*, после чего фрагмент, содержащий ген легкой цепи, встраивали в гидролизованную теми же эндонуклеазами рестрикции плазмиду рсDNA3.1/Hygro(+) («Invitrogen»), содержащую ген устойчивости к гигромицину Б. В результате получена плаزمида рСL1/hygro, несущая ген устойчивости к гигромицину Б и обеспечивающая продукцию легкой цепи полноразмерного антитела.

Для того чтобы в плазидах рСН1 и рСL1/hygro можно было заменять V-гены, получая при этом новые антитела с различной специфичностью, в эти плазмиды вводили дополнительные уникальные сайты гидролиза эндонуклеазами рестрикции в 5'- и 3'-участки V_H- и V_L-генов. Сайты подобраны таким образом, чтобы их введение минимально изменяло консервативную аминокислотную

последовательность N- и C-концов переменных доменов антител. В результате анализа последовательностей переменных доменов мышинных и человеческих антител с помощью базы данных Abysis (<http://www.bioinf.org.uk/abysis>) выбраны сайты эндонуклеаз *XhoI* и *Acc65I* для плазмиды рСН1 и сайты эндонуклеаз *EcoRV* и *HindIII* для плазмиды рСL1/hygro. Согласно базе данных V BASE (<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/>), эти сайты крайне редко встречаются в нуклеотидных последовательностях зародышевых генов переменных доменов антител.

Для конструирования кассетного вектора на основе плазмиды рСН1 из этой плазмиды предварительно удаляли некодирующий участок с 2 346 по 2 497 п. н., содержащий сайт *XhoI* (здесь и далее указаны координаты плазмиды рсDNA3.1(+), используемые производителем). Затем сайты эндонуклеаз рестрикции *XhoI* и *Acc65I* последовательно вводили методом мегапраймера [7; 8], в результате чего получили плазмиду рСНm, содержащую сайты *XhoI* и *Acc65I* в положениях 999 и 1 311 п. н. соответственно. Затем полученную плазмиду рСНm обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *XhoI* и *Acc65I* и объединяли в реакции лигирования с дуплетным олигонуклеотидным коннектором, последовательность которого приведена на рис. 1, а. В результате получили плазмиду рСН2g, обеспечивающую удобное клонирование генов, кодирующих V_H-домены различных антител.

Для конструирования кассетного вектора на основе плазмиды рСL1/hygro из этой плазмиды предварительно удаляли некодирующий участок полилинкера с 1 640 по 1 681 п. н., содержащий сайт *HindIII*, а также участок с 1 301 по 1 312 п. н. длиной 12 п. н., кодирующий неестественную для иммуноглобулинов вставку Ala-Leu-Gly-Arg между V_L- и C_L-доменами. Затем сайты эндонуклеаз рестрикции *EcoRV* и *HindIII* последовательно вводили методом мегапраймера [7; 8], в результате чего получили плазмиду рСLm4/hygro, содержащую сайты *EcoRV* и *HindIII* в положениях 977 и 1 283 п. н. соответственно. Затем полученную плазмиду рСLm4/hygro обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *EcoRV* и *HindIII* и объединяли в реакции лигирования с дуплетным олигонуклеотидным коннектором, последовательность которого пред-

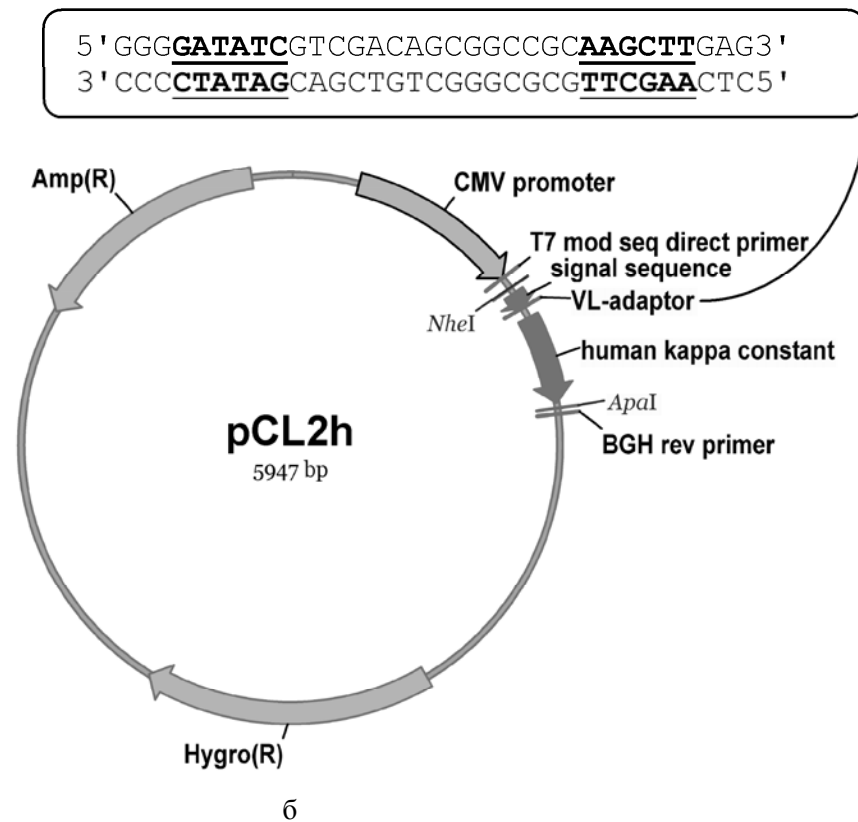
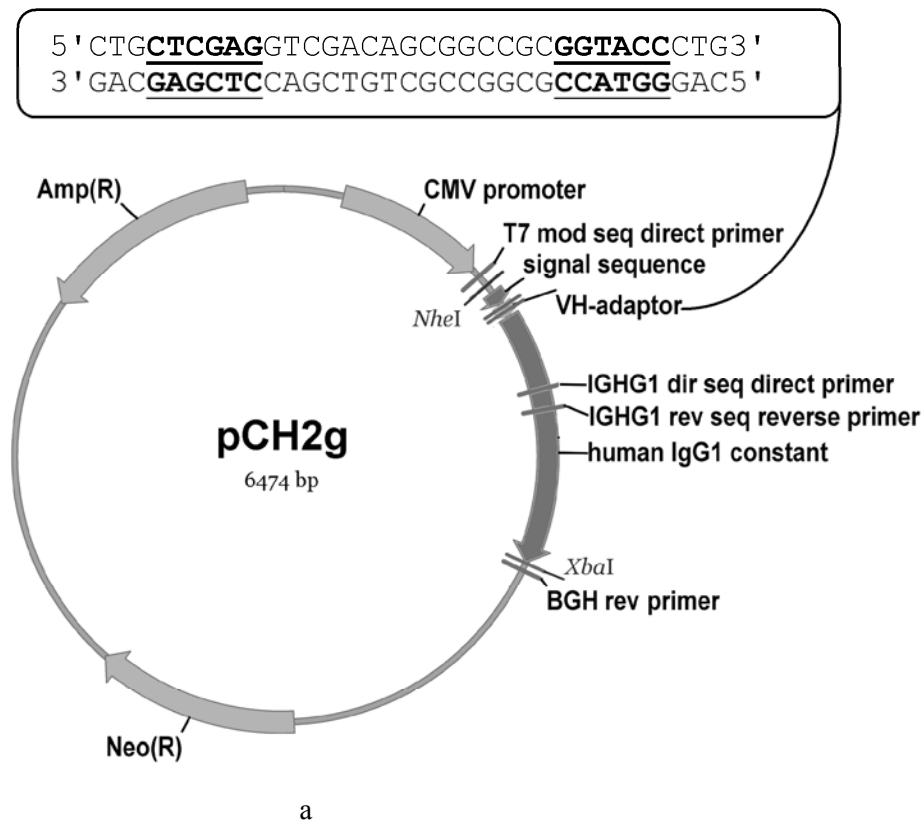


Рис. 1. Карты полученных плазмид pCH2g (а) и pCL2h (б): CMV promoter – цитомегаловирусный промотор; VH и VL – участки гена, кодирующие переменные домены тяжелой и легкой цепей антитела; human IgG1 constant – участок, кодирующий константные домены тяжелых цепей антител человека изоформа IgG1; human kappa constant – участок, кодирующий константный домен каппа-цепей антител человека; курсивом указаны сайты эндонуклеаз рестрикции

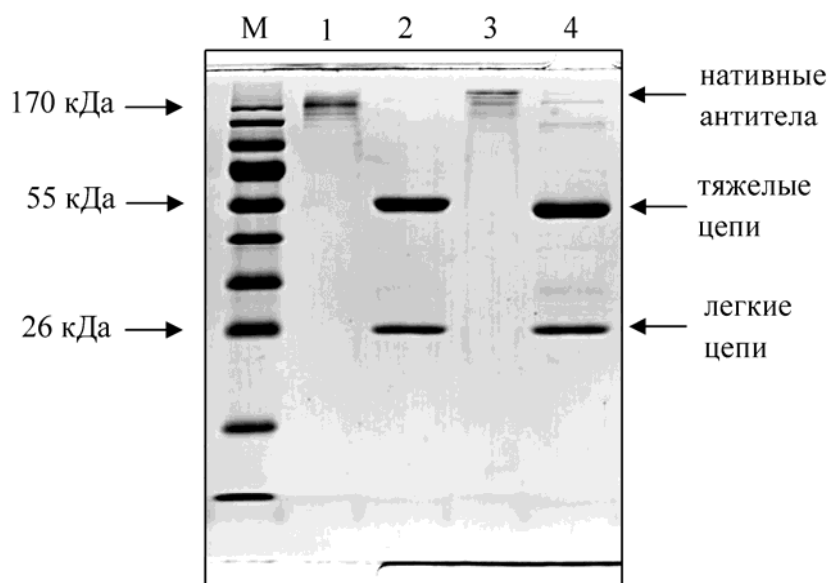


Рис. 2. Электрофореграмма антител ch1B1a и fh1A в 15 % полиакриламидном геле: 1 – нативное антитело ch1B1a; 2 – антитело ch1B1a, обработанное дитиотреитолом; 3 – нативное антитело fh1A; 4 – антитело fh1A, обработанное дитиотреитолом; М – маркер молекулярных масс

ставлена на рис. 1, б. В результате получили плазмиду pCL2h, обеспечивающую удобное клонирование генов, кодирующих V_L -домены различных антител.

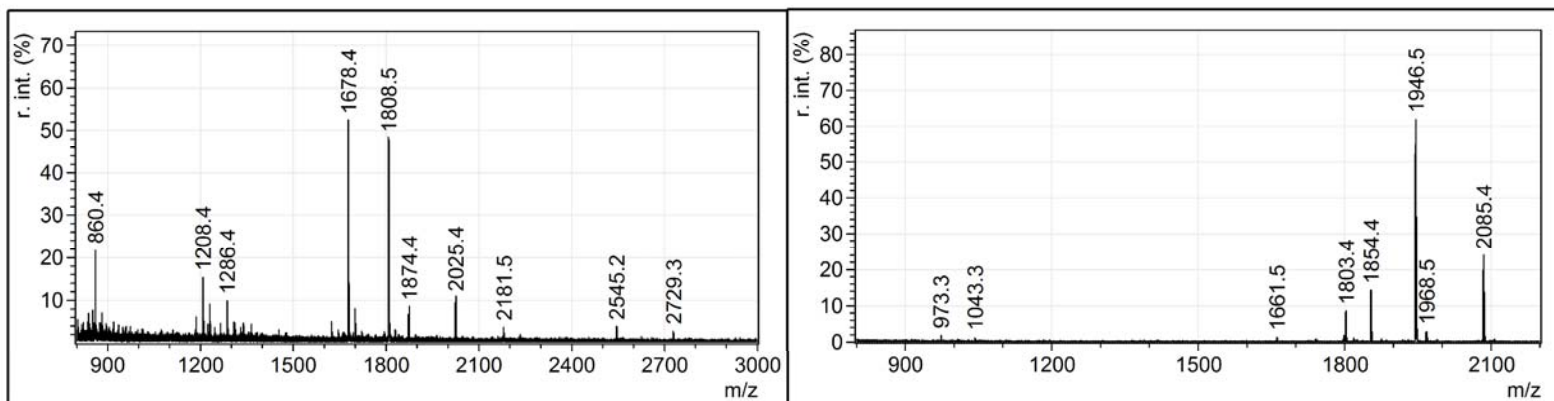
Получение антител ch1B1a и fh1A. ДНК-фрагменты VH-1B1 и VL-1B1, кодирующие V_H - и V_L -домены мышинового моноклонального антитела 1B1 [12; 13] против гликопротеина E ВКЭ, получены в результате ПЦР с плазмид pUC19-VH-1B1 и pUC19-VL-1B1 [14] с использованием праймеров VH_dir_XhoI, VH_rev_Acc65I, VL_dir_EcoRV и VL_rev_HindIII. ДНК-фрагменты VH-1A и VL-1A, кодирующие V_H - и V_L -домены фагового антитела 1A [15], отобранного из комбинаторной фаговой библиотеки против белка р35 вируса осповакцины, получены в результате ПЦР с плазмиды pHEN-1A с использованием тех же праймеров. Фрагменты VH-1B1 и VH-1A, а также плазмидная ДНК pCH2g гидролизваны эндонуклеазами XhoI и Acc65I и после электрофоретического разделения векторный фрагмент плазмиды объединен ДНК-лигазой фага T4 с каждым VH-фрагментом отдельно. В результате получены плазмидные ДНК pCH2g-1B1 и pCH2g-1A. Аналогично с использованием эндонуклеаз EcoRV и HindIII на основе

ПЦР-фрагментов VL-1B1 и VL-1A и плазмидной ДНК pCL2h получены плазмидные ДНК pCL2h-1B1a и pCL2h-1A.

Гуманизированное антитело ch1B1a получали в результате транзientной экспрессии в клетках яичников китайского хомячка, линия CHO-K1. Клетки трансфицировали одновременно двумя плазмидами pCH2g-1B1 и pCL2h-1B1a, отбор культуральной среды производили ежедневно в течение недели. Рекомбинантное антитело fh1A получали на основе плазмидных ДНК pCH2g-1A и pCL2h-1A аналогичным образом. Антитела выделяли из культуральной среды хроматографией на сорбенте с иммобилизованным белком A *Staphylococcus aureus* (SpA). Выход обоих антител составил около 0,5 мг белка с литра культуральной среды.

Электрофоретический анализ очищенных антител показал, что они представляют собой белки с молекулярной массой около 150 кДа. Предварительная инкубация с дитиотреитолом приводит к разделению антител на легкие и тяжелые цепи с молекулярной массой около 25 и 50 кДа соответственно (рис. 2).

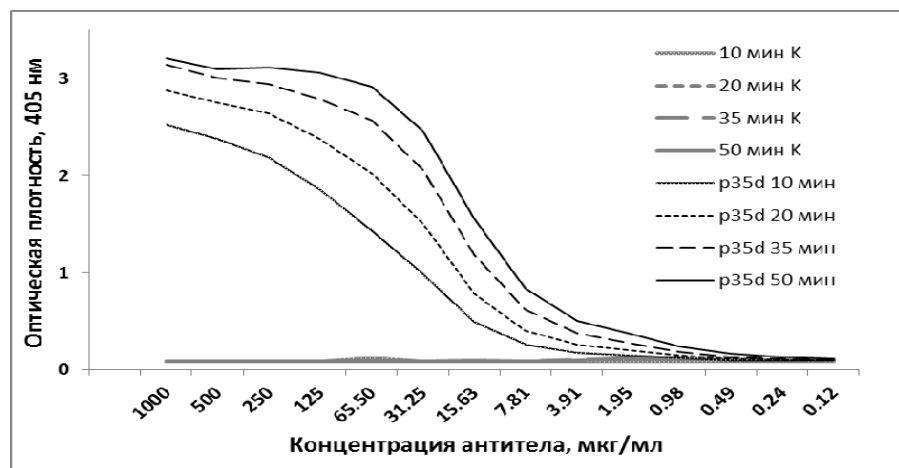
Масс-спектрометрический анализ фрагментов, образовавшихся в результате гидро-



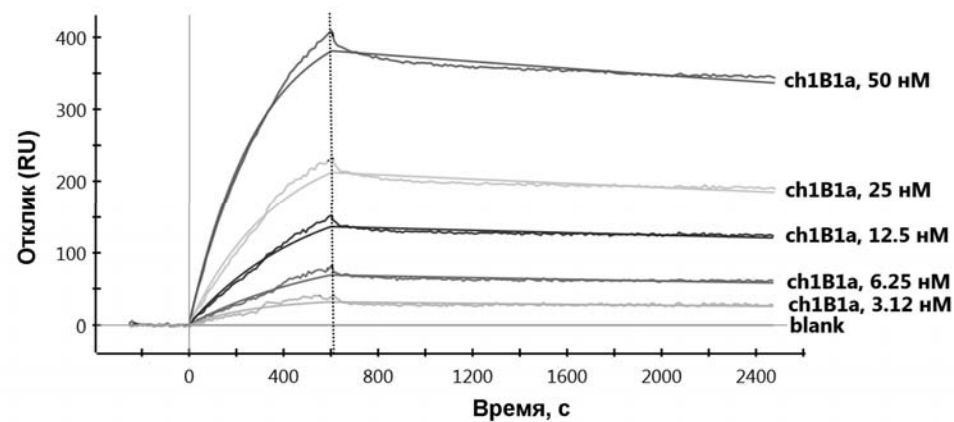
а

б

Рис. 3. Масс-спектр продуктов гидролиза трипсином тяжелой (а) и легкой (б) цепей антитела ch1B1a. Над пиками указано отношение массы к заряду m/z



а



б

Рис. 4. Взаимодействие антитела fh1A с рекомбинантным белком p35d (а) и антитела ch1B1a с рекомбинантным белком E (б)

лиза трипсином отдельно легких и тяжелых цепей антитела ch1B1a (рис. 3), подтвердил, что полученный белок является продуктом генов, расположенных в плаزمиде рСН2g-1B1 и рСЛ2h-1B1a.

Взаимодействие антитела fh1A с рекомбинантным белком р35d вируса оспы коров изучали с использованием ИФА. Для этого 100 нг белка р35d сорбировали в лунки иммунологических планшетов и инкубировали с последовательными двукратными разведениями антитела fh1A (начальная концентрация 1 мг/мл). График, иллюстрирующий взаимодействие, представлен на рис. 4, а. Рассчитанное значение равновесной константы аффинности составило $K_D = (5,1 \pm 0,6) \times 10^{-8}$ М.

Взаимодействие антитела ch1B1a с рекомбинантным белком Е вируса клещевого энцефалита исследовано на оптическом биосенсоре ProteOn XPR36 («Bio-Rad»). Белок Е ковалентно иммобилизовали на поверхность биосенсора, а антитело ch1B1a находилось в растворе. График, иллюстрирующий это взаимодействие, представлен на рис. 4, б. Рассчитанные значения констант скорости ассоциации и диссоциации составили $k_{on} = (1,5 \pm 0,01) \times 10^5$ М⁻¹с⁻¹, $k_{off} = (7,0 \pm 0,1) \times 10^{-5}$ с⁻¹. Значение равновесной константы аффинности составило $K_D = (4,7 \pm 0,1) \times 10^{-10}$ М.

Заключение

Сконструированы две оригинальные касетные плазмиды рСН2g и рСЛ2h для получения полноразмерных рекомбинантных антител в эукариотических клетках. На основе этих плазмид сконструированы плазмиды рСН2g-1B1 и рСЛ2h-1B1a, а также рСН2g-1A и рСЛ2h-1A, обеспечившие продукцию химерного антитела ch1B1a против белка Е вируса клещевого энцефалита и полноразмерного человеческого антитела fh1A против иммунодоминантного белка р35 ортопоксвирусов в клетках СНО-K1 соответственно. Подтверждена способность полученных антител специфически связывать целевой антиген.

Список литературы

1. Saleem M., Kamal M. Monoclonal Antibodies in Clinical Diagnosis: A Brief Review

Application // African J. Biotechnol. 2008. Vol. 7, № 8. P. 923–925.

2. Arruebo M., Valladares M., Gonzalez-Fernandez A. Antibody-Conjugated Nanoparticles for Biomedical Applications // J. Nanomaterials. 2009. Vol. 2009. P. 1–24.

3. Kelley B. Industrialization of mAb Production Technology: The Bioprocessing Industry at a Crossroads // MAbs. 2009. Vol. 1, № 5. P. 443–452.

4. Scolnik P. A. MAbs: A Business Perspective // MAbs. 2009. Vol. 1, № 2. P. 179–184.

5. Mohan C., Kim Y. G., Koo J., Lee G. M. Assessment of Cell Engineering Strategies for Improved Therapeutic Protein Production in CHO Cells // Biotechnol. J. 2008. Vol. 3, № 5. P. 624–630.

6. Шингарова Л. Н., Тикунова Н. В., Юн Т. Э., Чепурнов А. А., Алиев Т. К., Батанова Т. А., Болдырева Е. Ф., Некрасова О. В., Топорова В. А., Панина А. А., Курпичников М. П., Сандахчиев Л. С. Рекомбинантное полноразмерное антитело человека против вируса Эбола // Биоорг. химия. 2007. Т. 33, № 6. С. 598–605.

7. Giebel L. B., Spritz R. A. Site-Directed Mutagenesis Using a Double-Stranded DNA Fragment as a PCR Primer // Nucleic Acids Res. 1990. Vol. 18, № 16. P. 4947.

8. Ke S. H., Madison E. L. Rapid and Efficient Site-Directed Mutagenesis by Single-Tube 'Megaprimer' PCR Method // Nucleic Acids Res. 1997. Vol. 25, № 16. P. 3371–3372.

9. Laemmly U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227. P. 680–685.

10. Нетесова Н. А., Белавин П. А., Малыгин Э. Г., Рукавишников М. Ю. Рекомбинантная плазмидная ДНК рGSDEI, кодирующая белок Е вируса клещевого энцефалита и штамм *Escherichia coli* – продуцент рекомбинантного белка Е вируса клещевого энцефалита // Патент РФ. 1999. № 2136754.

11. Wurm F. M. Production of Recombinant Protein Therapeutics in Cultivated Mammalian Cells // Nat. Biotechnol. 2004. Vol. 22, № 11. P. 1393–1398.

12. Матвеев Л. Э., Годовиков А. А., Караванов А. С., Плетнев А. Г., Рубин С. Г., Семашко И. В., Чумаков М. П., Цехановская Н. А., Прессман Е. К. Моноклональные антитела к гликопротеину вируса клещевого энцефалита: предварительная характеристика // Вопр. вирусол. 1989. Т. 34. С. 694–697.

13. *Tsekhanovskaya N. A., Matveev L. E., Rubin S. G., Karavanov A. S., Pressman E. K.* Epitope Analysis of Tick-Borne Encephalitis (TBE) Complex Viruses Using Monoclonal Antibodies to Envelope Glycoprotein of TBE Virus (Persulcatus Subtype) // *Virus Res.* 1993. Vol. 30, № 1. P. 1–16.

14. *Байков И. К., Матвеев Л. Э., Матвеев А. Л., Тикунова Н. В.* Сравнительный анализ переменных доменов моноклональных антител против вируса клещевого энцефа-

лита // *Сиб. мед. журн.* 2012. Т. 111, № 4. С. 30–33.

15. *Tikunova N., Dubrovskaya V., Morozova V., Yun T., Khlusevich Y., Bormotov N., Laman A., Brovko F., Shvalov A., Belanov E.* The Neutralizing Human Recombinant Antibodies to Pathogenic Orthopoxviruses Derived from a Phage Display Immune Library // *Virus Res.* 2012. Vol. 163. P. 141–150.

Материал поступил в редколлегию 25.06.2013

I. K. Baykov, Ya. A. Khlusevich, A. L. Matveev, I. N. Babkina, N. V. Tikunova

CONSTRUCTION OF CASSETTE VECTOR PLASMIDS FOR PRODUCTION OF FULL-SIZE RECOMBINANT ANTIBODIES

Original cassette vector plasmids pCH2g and pCL2h for cloning V-genes encoding variable domains of antibody heavy and light chains and production of recombinant full-size antibodies in eukaryotic cells have been constructed. Plasmids pCH2g-1B1, pCL2h-1B1a and pCH2g-1A, pCL2h-1A have been developed on the base of pCH2g and pCL2h. These pairs of plasmids provided production of chimeric antibody ch1B1a against recombinant tick-borne encephalitis protein E and fully human antibody fh1A against orthopoxvirus immunodominant protein p35, respectively. Structure of these antibodies has been proven by electrophoresis and mass-spectrometry. The ability of these antibodies to bind specific antigens has been confirmed by ELISA and optical biosensor ProteOn XPR36 studies; affinity constants have been measured.

Keywords: plasmids, cloning, chimeric antibody, fully human antibody.