

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ РЕНАТУРАТА ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА-2В ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО РЕКОМБИНАНТНОГО

Е.А. Пименова, Е.А. Мотина, В.В. Кутузова, С.Ф. Яковлева

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

На сегодняшний день мир сталкивается все с новыми вызовами, связанными с распространением тяжелых вирусных заболеваний. Интерфероны альфа-2а и альфа-2b являются препаратами, которые широко используются в медицинской и ветеринарной практике при лечении различных заболеваний. Они применяются для борьбы с вирусами и рецидивами онкологических заболеваний.

Разработка и реализация эффективной технологии, позволяющей оптимизировать синтез интерферона альфа-2b с целью получения более высокого выхода продукта, является актуальной задачей промышленного производства. Это связано с широким спектром биологических свойств интерферона как иммуномодулятора. Высоко актуальной является задача обеспечения внутреннего рынка России субстанцией интерферона альфа-2а и альфа-2b отечественного производства, а также создания коммерчески рентабельной технологии производства субстанции на основе высокопродуктивных систем промышленного получения и хроматографической очистки генетически модифицированных бактериальных продуцентов

Цель работы – изменение состава денатурирующего буфера с проведением растворяющих тел включения в буферах, используемых на этапе денатурации интерферонов.

Внешние проявления денатурации сводятся к потере растворимости, особенно в изoeлектрической точке, повышению вязкости белковых растворов, увеличению количества свободных функциональных SH-групп и изменению характера рассеивания рентгеновских лучей. Наиболее характерным признаком денатурации является резкое снижение или полная потеря белком его биологической активности. При денатурации белка, вызванной мочевиной или гуанидином, например, 6М гуанидином или 8М мочевиной, разрушаются в основном нековалентные связи (в частности, гидрофобные взаимодействия и водородные связи). Дисульфидные связи в присутствии восстанавливающего агента меркаптоэтанола разрываются, в то время как пептидные связи самого остова полипептидной цепи не затрагиваются. В этих условиях разворачиваются глобулы нативных белковых молекул и образуются случайные и беспорядочные структуры.

На этапе растворения тел включения и восстановлении белка в ходе эксперимента были использованы буферы следующих составов:

Буфер № 1: гуанидин гидрохлорид – 6 М; прис-(гидроксиметил) – аминотан – 20 мМ.

Буфер № 2: гуанидин гидрохлорид – 7 М; прис-(гидроксиметил) – аминотан – 50 мМ; натрия хлорид – 150 мМ; ЭДТА – 1 мМ.

Буфер № 3: гуанидин гидрохлорид – 8 М; трис-(гидроксиметил) – аминотан – 1 М; ЭДТА – 1 мМ.

Буфер № 4: мочевина – 8 М; ЭДТА – 1 М; трис-(гидроксиметил) – аминотан – 0,1 М.

Растворы готовили следующим образом: тельца включения массой 1000 г. измельчали и распределяли равными частями по 250 г. на 4 химических стакана, объемом 3 – 5 л. Затем вносили по 1900 мл буфера в каждый стакан и разминая тельца в растворе, проводили их растворение.

К раствору денатурированного белка с помощью автоматической пипетки добавляли 2-меркаптоэтанол до концентрации 100 ммоль/л.

Полученный раствор белка инкубировали 16 часов при комнатной температуре и постоянном перемешивании.

После инкубирования с помощью автоматической пипетки отбирали аликвоту для определения массы белков с помощью спектрофотометра при $OD_{\lambda=280\text{ нм}}$ и $\lambda=260\text{ нм}$.

Согласно полученным результатам, буфер содержащий 6М гуанидин гидрохлорид, 20 мМ трис-(гидроксиметил) – аминотан обеспечивают оптимальные условия для денатурации белка, о чем свидетельствует повышенная масса и концентрация белка.