

УДК 577.112.083

РАЗРАБОТКА МАСШТАБИРУЕМОГО МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ РЕКОМБИНАНТНОЙ СЕКРЕТОРНОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ А2 ПРИ ЭКСПРЕССИИ В МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖАХ *Pichia pastoris*

© 2019 г. С. Ю. Филькин¹, *, Н. В. Чертова¹, А. А. Зенин¹, А. В. Липкин¹,
Э. Г. Садыхов¹, А. Н. Фёдоров¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: s.filkin@fbras.ru

Поступила в редакцию 14.05.2019 г.

После доработки 03.06.2019 г.

Принята к публикации 20.06.2019 г.

Получен эффективный рекомбинантный штамм метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*, продуцирующий с высоким выходом активную фосфолипазу А2. В результате проведения трех этапов очистки получен препарат ~90%-ной чистоты. Результаты оценки воспроизводимости методов хроматографического разделения ФЛА2 дают основание считать разработанный протокол приемлемым для масштабирования, а выделенная фосфолипаза А2 может быть использована для промышленных целей.

Ключевые слова: фосфолипаза А2, метилотрофные дрожжи, *Pichia pastoris*

DOI: 10.1134/S0555109919060084

Секреторная фосфолипаза А2 (ФЛА2, КФ 3.1.1.4) катализирует гидролиз эфирной связи в sn-2 положении фосфолипидов, высвобождая жирные кислоты. ФЛА2 является важным промышленным ферментом, широко применяется, как в пищевой промышленности, так и в агропромышленной отрасли. Использование секретируемой ФЛА2 из свиной поджелудочной железы или ядов змей имеет давние традиции в производстве яичного желтка для эмульгирования в майонезе, соусах, хлебопекарной промышленности или очистке растительных масел.

Развитие и разработка принципиально новых и высокоэффективных методов получения и промышленной очистки ФЛА2 является важной и актуальной задачей современной биотехнологии [1]. ФЛА2 присутствуют в клетках различных организмов и обладают широкой специфичностью [2]. В настоящее время разработаны различные экспрессионные системы для синтеза секреторной фосфолипазы А2 в *Streptomyces violaceoruber* [3]. Первые системы экспрессии рекомбинантной свиной ФЛА2 были созданы для *Saccharomyces cerevisiae* [4]. В дальнейшем была экспрессирована человеческая секреторная ФЛА2 в *E.coli* [5]. Для промышленного производства человеческой фосфолипазы А2 была разработана система экспрессии ФЛА2 в клетках яичников китайских хомячка СНО [6].

Третичная структура ФЛА2 из *Streptomyces* была расшифрована в 2000 г. [7]. В 2015 г. была охарактеризована рекомбинантная ФЛА2 из *Streptomyces*, экспрессированная в *Pichia pastoris* [8]. Использование системы экспрессии *P. pastoris* является успешной альтернативой экспрессии в клетках *E. coli*. при промышленном получении рекомбинантной фосфолипазы А2. С этой целью были разработаны штаммы-суперпродуценты с высокой копийностью целевого гена, позволившие увеличить продукцию фермента в 1.4 раза и тем самым повысить эффективность производства [9]. Также существуют различные способы стабилизации фермента и сохранения и его активности, в том числе его иммобилизация [10]. Однако, в настоящее время нет эффективных методов промышленного получения высокоочищенной ФЛА2 и по-прежнему вопрос по разработке таких методов стоит очень остро.

Цель работы – оптимизация ранее известных методов получения и очистки рекомбинантной фосфолипазы А2 при экспрессии в *P. pastoris* для промышленного получения фермента высокой степени очистки.

МЕТОДИКА

Конструирование вектора для экспрессии ФЛА2.
Для получения штамма-продуцента использова-

ли ген фосфолипазы A2 *Streptomyces violaceoruber*, зарегистрированный в GenBank (Sequence ID AY359866.1). В качестве штамма-реципиента были выбраны метилотрофные дрожжи *P. pastoris*. Экспрессионная система *P. pastoris* обладала рядом преимуществ: непатогенность, способность к быстрому росту клеток и получению высокой плотности биомассы при культивировании, наличие одного из самых сильных и регулируемых промоторов гена алкогольоксидазы (AOX1-промотор), способность к оптимальному гликозилированию многих белков и ферментов, наличие механизмов эффективной секреции продуцируемых белков в культуральную среду, низкая секреция протеаз и других собственных белков в культуральную среду и др. В качестве экспрессионного вектора для *P. pastoris* использовали рPICZalphaA ("Thermo Fisher Scientific", США). Фрагмент ДНК, соответствующий гену ФЛА2 длиной 363 пар оснований, встраивали в рPICZalphaA по сайтам рестрикции *EcoRI/Sall*.

Трансформация гена ФЛА2 в *P. pastoris*. Для генетической трансформации *P. pastoris* использовали штамм X-33 ("Thermo Fisher Scientific", США). Культивирование дрожжей проводили на жидкой питательной среде YPD (пептон – 2%, глюкоза – 2%, дрожжевой экстракт – 1%) до ОП₆₀₀ 1.4. Трансформацию *P. pastoris* проводили вектором рPICZα-ФЛА2, предварительно линейризованным по сайту рестрикции *BstXI* методом электропорации (Micro-pulser, "Bio-Rad", кюветы 0.2 см). Трансформация была проведена по описанной в работе [8] методике.

Культивирование трансформантов. Культивирование трансформантов проводили в ферментере Biostat V+ ("Sartorius", Германия) общий объем 6.6 л, рабочий объем 0.4–5.0 л при 30°C и скорости подачи воздуха – 6 л/мин до достижения концентрации биомассы 220 г/л; далее температуру снижали до 20°C и культивировали клетки в течение 100 ч.

Выделение и очистка ФЛА2. По окончании культивирования клетки осаждали центрифугированием при 16000 g в течение 10 мин при охлаждении до 4°C. Культуральную жидкость концентрировали с использованием мембраны тангенциальной фильтрации Midikros 10 кДа ("VWR", США).

На следующем этапе для оптимизации очистки рекомбинантной ФЛА2 тестировали различные методы ионнообменной хроматографии. Катион-обменную хроматографию проводили на колонке с Sepharose SP Fast Flow ("GE Healthcare", США) объемом 5 мл при скорости потока 1 мл/мин. Элюцию осуществляли 0.01 М раствором цитрата натрия в градиенте NaCl от 0 до 1.0 М. Для оптимизации условий разделения при использовании катион-обменной хроматографии pH варьировали в пределах 4.0–5.2. Анион-обменную хроматографию проводили на колонке HiTrap Q XL ("GE

Healthcare", США) объемом 5 мл при скорости потока 1 мл/мин. В качестве элюента использовали 0.05 М трис-НСl буфер pH 8.0 в градиенте NaCl от 0 до 1.0 М.

На последнем этапе очистки и для концентрирования рекомбинантной ФЛА2 использовали гидрофобную хроматографию на колонке с Butyl-Sepharose Fast Flow (Flow ("GE Healthcare", США) объемом 5 мл. ФЛА2 элюировали 50 мМ трис-НСl буфером, pH-8.0 в градиенте NaCl от 3.0 до 0 М при скорости потока 1 мл/мин.

Определение фосфолипазной активности. Фосфолипазную активность определяли согласно [11] с использованием флуоресцентного субстрата 1-пальмитоил-2-(10-пиренилдеканойл)-sn-глицеро-3-фосфорилхолина (10-pyrene PC, "Molecular Probes", Голландия). Для измерения флуоресценции к 1 мл 50 мМ трис-НСl буфера, pH-7.5, содержащего 100 мМ NaCl и 1.0 мМ ЭДТА, добавляли 10 мкл субстрата (конечная концентрация 2 мкМ), 10 мкл 10%-ного раствора БСА (конечная концентрация 0.1%), и 6 мкл 1 М CaCl₂ (конечная концентрация 6 мМ). Реакцию инициировали добавлением 5 мкл раствора ФЛА2 с концентрацией 0.5 мг/мл. В качестве положительного контроля использовали кислую ФЛА2 СМ2 из яда кобры (*Naja kaouthia*). Флуоресценцию измеряли на флуоресцентном спектрофотометре Fluoromax-4 ("Horiba Scientific", Великобритания) ($\lambda_{\text{ex, макс}} = 345 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{em, макс}} = 395 \text{ нм}$).

Активность фосфолипазы A2 рассчитывали по формуле $A = 2 \times 10^{-4} (S - S_0) V / F_{\text{макс}}$ и приводили в мг белка, где S – увеличение интенсивности флуоресценции за 1 мин в присутствии фосфолипазы; S_0 – увеличение интенсивности флуоресценции в минуту в контроле; V – объем добавляемого 0.2 мМ 10-pyrene PC, мкл; $F_{\text{макс}}$ – максимальная интенсивность флуоресценции при добавлении 5 мкг кислой ФЛА2 СМ2 из яда кобры (*N. kaouthia*). За единицу стандартной активности принимали количество фермента, которое катализирует превращение одного микромоля субстрата в минуту при стандартных условиях (оптимум pH, избыток субстрата, температура 25°C). Чувствительность определения позволяет измерять пикомоли фосфолипидов, гидролизованных за 1 мин. При данном способе измерения активность фосфолипазы остается пропорциональной концентрации фермента в течение трех порядков. Данный способ может быть использован для количественной оценки активности фосфолипазы в неочищенных экстрактах с низкой удельной активностью.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученный вектор рPICZα-ФЛА2 линейризовали по сайту *BstXI* и проводили трансформацию компетентных клеток *P. pastoris*. В результа-

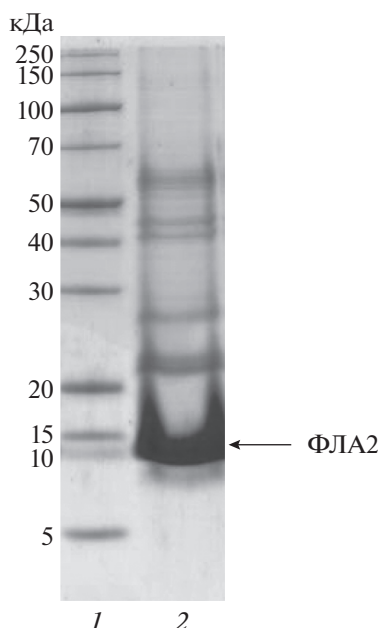


Рис. 1. Электрофореграмма ФЛА2 после тангенциальной фильтрации. 1 – маркеры молекулярного веса, кДа; 2 – препарат фосфолипазы А2 после тангенциальной фильтрации. Полоса фосфолипазы А2 соответствует молекулярной массе в 14 кДа.

те было отобрано 30 клонов с вектором рPICZalpha-ФЛА2. Полученные клоны переносили на чашки YPD с зеоцином (200 мкг/мл). Отобранные клоны X-33 *P. pastoris* проверяли на наличие вставки методом ПЦР.

Для промышленного получения штамма-продукта были подобраны оптимальные условия культивирования *P. pastoris* рPICZalpha-ФЛА2, что позволило получить высокие выходы фермента (20% по суммарному клеточному белку). Условия культивирования описаны в разделе “Методика”. Уровень удельной активности рекомбинантной ФЛА2 в культуральной жидкости составлял 1200 ед./мг.

Чрезвычайно важным параметром при проведении тангенциальной фильтрации является степень концентрирования. При превышении определенного уровня по степени концентрирования увеличивалось количество выпавшего целевого белка в осадок на фильтре. С целью установления оптимальной степени концентрирования была проведена серия экспериментов. Было найдено, что оптимальная степень концентрирования 4.5–5 раз.

В результате использования анионообменной хроматографии удалось достигнуть более высокой очистки, по сравнению с очисткой на катионитах. В процессе проведения двух стадий (анионной и гидрофобной) хроматографии удалось добиться значительной степени очистки ФЛА2 (90%).

После концентрирования при помощи тангенциальной фильтрации был получен раствор белка.

Состав полученного белкового раствора был протестирован методом электрофореза в ПААГ по Лемли, использовали маркеры PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder (“Thermo Fisher Scientific”, США, рис. 1). По денситометрическому анализу данный препарат содержал большое количество белковых примесей (примерно 40–50% от тотального белка в растворе), а удельная активность ФЛА2 составляла 3000 ед./мг.

Для выделения целевого продукта ФЛА2 были протестированы два вида ионообменной хроматографии.

Первоначально для очистки ФЛА2 использовали катионообменную хроматографию (рис. 2). Для этого был проведен поиск оптимальных условий хроматографического разделения на катионном носителе Sepharose SP Fast Flow. Для оптимального разделения рассматривались элюирующие буферы 0.01 М цитрата натрия с рН в диапазоне от 4.0 до 5.2. На рис. 2а приведены хроматограмма в цитратном буфере при рН 5.2, а на рис. 2б – электрофореграмма профиля катионообменной хроматографии ФЛА2. Перед нанесением на хроматографическую колонку раствор ФЛА2, полученный после тангенциальной фильтрации, для снижения концентрации солей разбавляли в 50 раз 0.01 М буфером цитрата натрия рН 5.2 и фильтровали через фильтр Chromafil с порами 0.45 мкм (“Macherey-Nagel”, Германия). Оптимальные условия для разделения были достигнуты при уравнивании колонки 0.01 М цитратом натрия, рН 5.2. Пробоподготовка ФЛА2 перед нанесением на хроматографическую колонку позволила получить незначительную очистку препарата (дорожки 1 и 2 на рис. 2б). Однако, проведенная хроматография оказалась не эффективной. Часть белка при разделении не адсорбировалась на колонке (дорожка 4 на рис. 2б), а другая часть распределялась по профилю элюции (дорожки 5–10 на рис. 2б).

Анионообменную хроматографию проводили на сорбенте Sepharose Q Fast Flow (рис. 3). Полученный после тангенциальной фильтрации раствор ФЛА2 для снижения концентрации солей разбавляли 50-кратным объемом буфера 20 мМ Трис-НСl рН 8.0, фильтровали через фильтр Chromafil с порами 0.45 мкм и наносили на хроматографическую колонку Sepharose Q Fast Flow. Элюцию проводили 20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, в градиенте 0–1 М NaCl (рис. 3а). Хроматографические фракции были анализировали методом электрофореза в ПААГ по Лемли. Электрофоретический анализ показал, что целевой продукт ФЛА2 выходил с колонки в не адсорбированных фракциях, при этом другие белковые примеси адсорбировались на колонке. С целью оптимизации протокола очистки на анионообменной смоле были протестированы варианты с уменьшением кратности разведения раствора ФЛА2 после тангенциальной фильтрации.

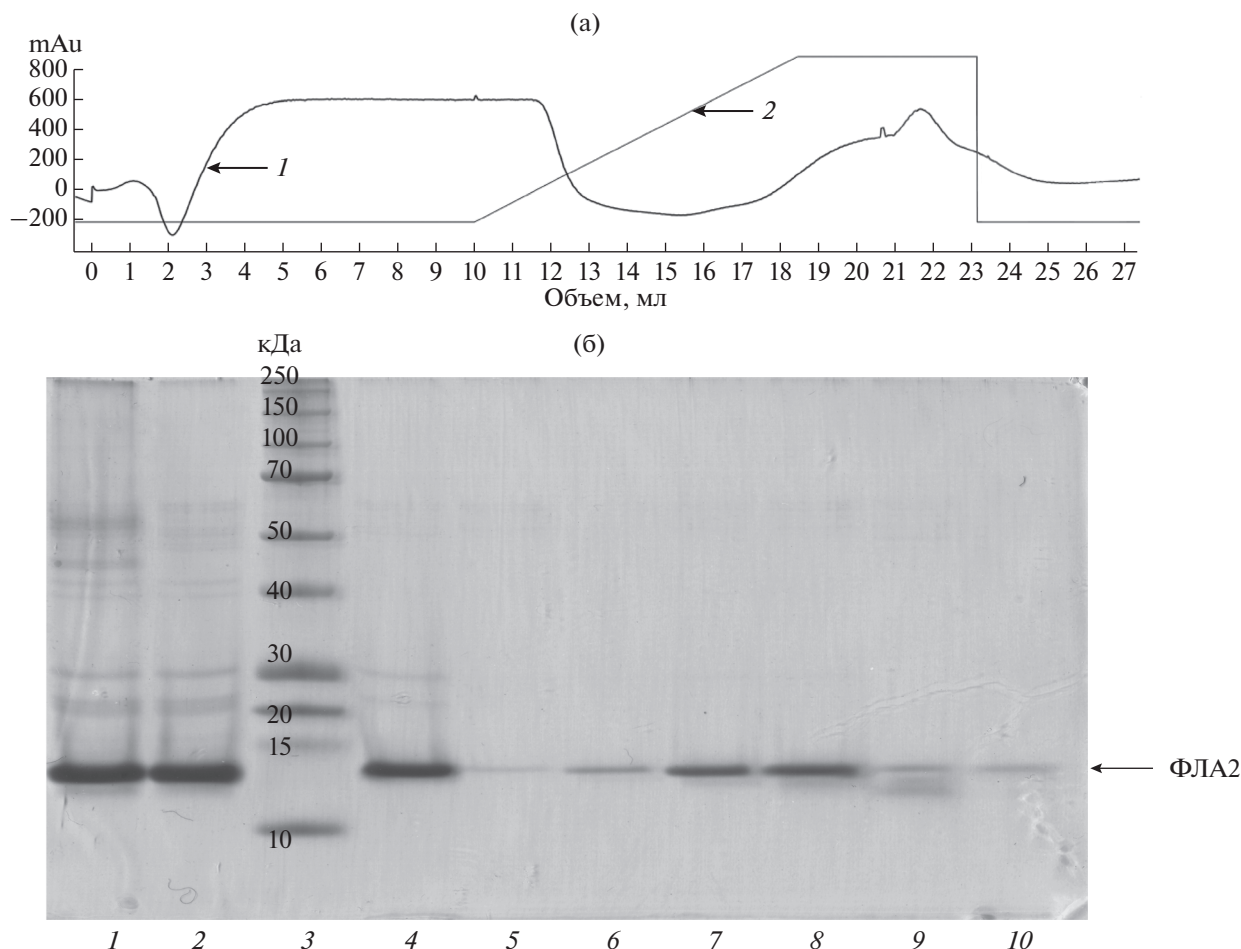


Рис. 2. Хроматографическая очистка ФЛА2 на сорбенте Sepharose SP Fast Flow (а) и электрофореграмма фракций по ходу очистки (б). 1 – препарат ФЛА2 после тангенциальной фильтрации, 2 – препарат ФЛА2 перед нанесением на колонку с Sepharose SP Fast Flow, 3 – маркеры молекулярного веса, кДа; 4 – не адсорбированная фракция, сошедшая с колонки с 3 по 12 мл; 5–10 – фракции, сошедшие с колонки в 15, 17, 19, 21, 23, 25 мл хроматографии соответственно. Полоса фосфолипазы А2 соответствует молекулярной массе в 14 кДа. Стрелки 1 и 2 указывают на профиль хроматографии и градиент NaCl соответственно.

Показано, что при 10-кратном разбавлении раствора фосфолипазы А2 целевой продукт по-прежнему не адсорбировался на сорбенте Sepharose Q Fast Flow, а другие белковые примеси сорбировались на нем. В отличие от пробоподготовки перед катионообменной хроматографией пробоподготовка в данном случае не дала дополнительной очистки (дорожки 2 и 3 на рис. 3б). Чистота фракции после анионообменной хроматографии была ~80% по белку ФЛА2 (рис. 3), а удельная активность составила 4400 ед./мг.

С помощью анионообменной хроматографии фермент ФЛА2 удалось отделить от большинства белковых примесей. Однако, оставалась белковая примесь с молекулярной массой 27 кДа. Присутствующая примесь в области 27 кДа могла быть димером фосфолипазы А2 [12]. Для концентрирования и дополнительной очистки препарата ФЛА2 проводили хроматографию гидрофобных

взаимодействий. В качестве сорбента была использована хроматографическая смола Butyl-Sepharose Fast Flow. К не адсорбированной фракции после анионообменной хроматографии добавляли сухой хлорид натрия до концентрации 3.0 М и наносили на хроматографическую колонку при скорости потока 1 мл/мин. Элюцию проводили 20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, понижая содержание NaCl (рис. 4а). Собранные фракции анализировали методом электрофореза в ПААГ по Лемли (рис. 4б, 4в). Фракции, выходявшие с колонки в объеме 65–75 мл, содержали высокоочищенный препарат ФЛА2 (рис. 4, табл. 1).

Гидрофобная хроматография позволила избавиться от подавляющего большинства белковых примесей, добиться высокой (~90% по данным денситометрического анализа) степени очистки, а также сконцентрировать образец. После проведения очистки удельная активность раствора содер-

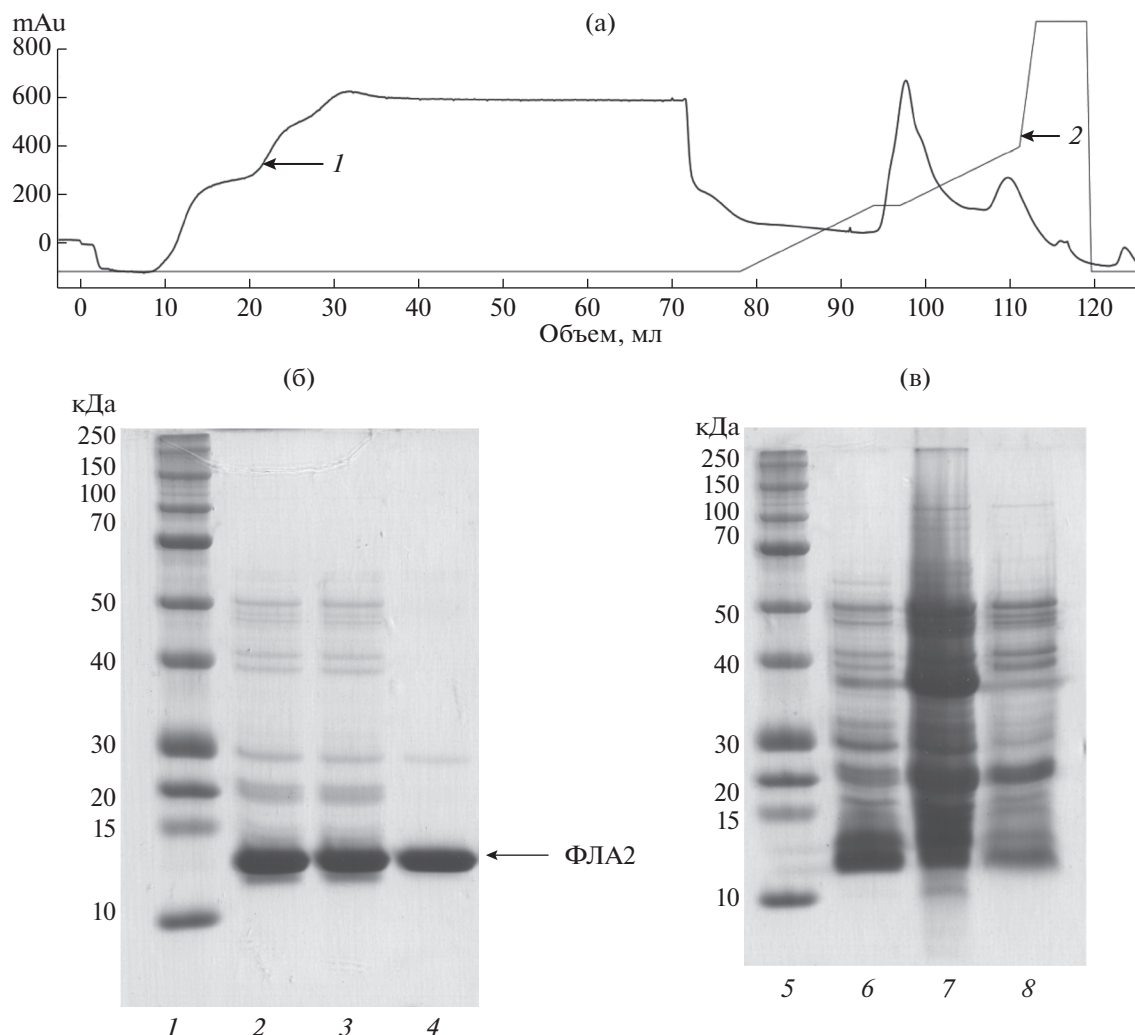


Рис. 3. Хроматографическая очистка ФЛА2 на колонке с Sepharose Q Fast Flow (а) и электрофореграммы фракций (б, в). 1, 5 – маркеры молекулярного веса, кДа; 2 – препарат ФЛА2 после тангенциальной фильтрации; 3 – препарат ФЛА2 перед нанесением на колонку Sepharose Q Fast Flow, 4 – не адсорбированная фракция с 20 по 70 мл; 6–8 – фракции, вышедшие в 100, 110 и 115 мл. Полоса фосфолипазы А2 соответствует молекулярной массе в 14 кДа. 1, 2 – профиль элюции белка и градиент NaCl соответственно.

Таблица 1. Стадии выделения фосфолипазы А2

Стадии очистки	Общий объем, мл	Активность ФЛА2, ед./мл	Белок, мг	Удельная активность, Е/мг	Чистота препарата ФЛА2 (по белку)	Выход, %
Супернатант	250	600 ± 30	125 ± 12.5	1200 ± 60	20%	100
Тангенциальное фильтрование и концентрирование	50	2700 ± 150	45 ± 4.5	3000 ± 150	50–55%	90 ± 9
Катионообменная хроматография на Sepharose SP Fast Flow	25	– *	40 ± 4	–*	60–70%	82 ± 8
Анионообменная хроматография на Sepharose Q Fast Flow	40	3000 ± 150	28.1 ± 2.8	4400 ± 220	80%	82 ± 8
Гидрофобная хроматография на Butyl-Sepharose Fast Flow	8	14400 ± 720	22.5 ± 2.3	4900 ± 245	90–95%	74 ± 7.4

* Активность препарата после катионообменной хроматографии не определяли.

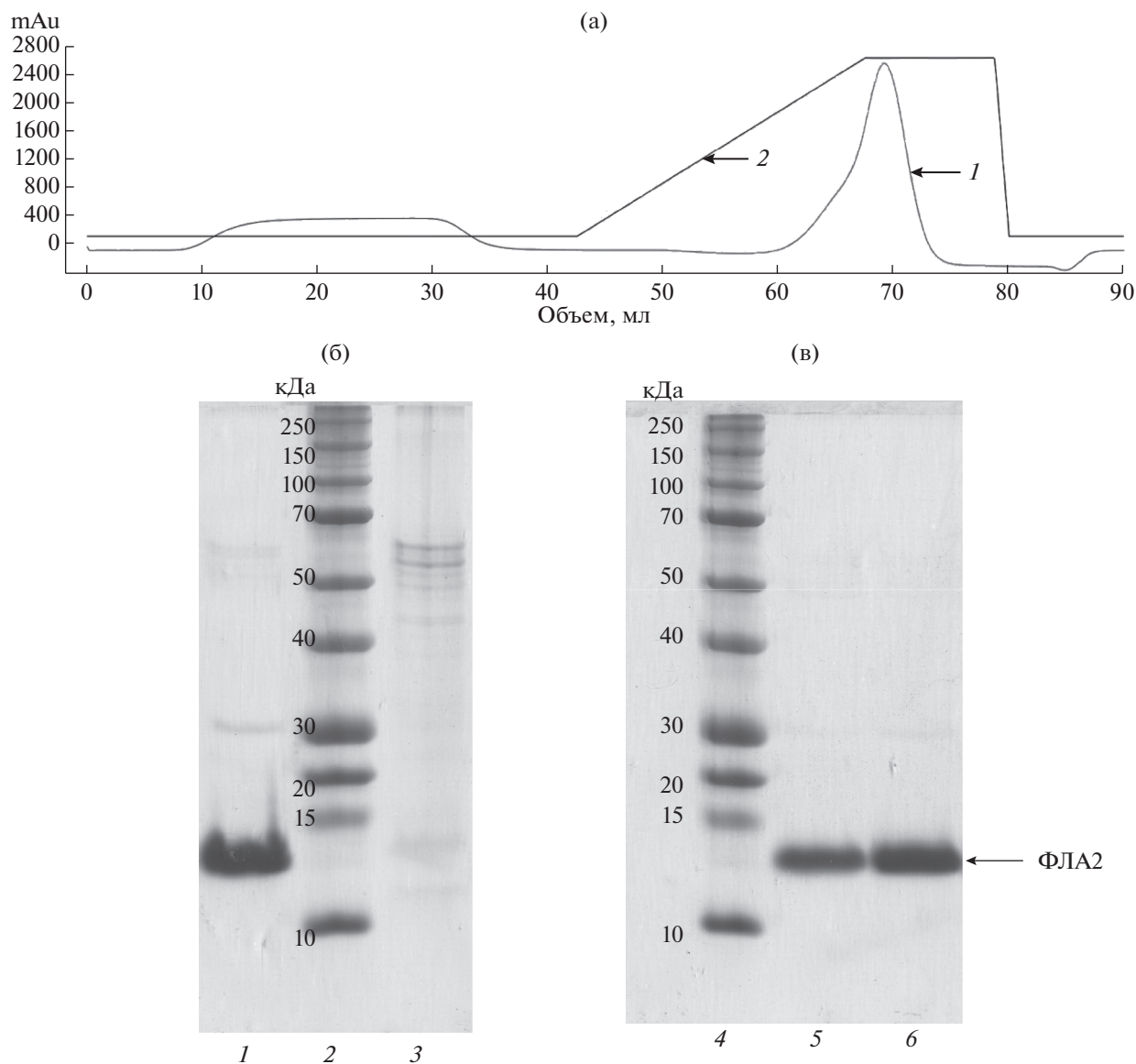


Рис. 4. Хроматографическая очистка препарата ФЛА2 на сорбенте Butyl-Sepharose Fast Flow (а) электрофореграммы фракций после гидрофобной хроматографии (б и в). 1 – препарат ФЛА2 перед нанесением на колонку с Butyl-Sepharose Fast Flow; 2,4 маркеры молекулярного веса, кДа; 3 – не адсорбированная фракция – 10–32 мл; 5, 6 – фракции с колонки в 65 и 70 мл соответственно. Полоса фосфолипазы А2 соответствует молекулярной массе в 14 кДа. 1, 2 – профиль элюции белка и градиент NaCl соответственно.

жашего фосфолипазу А2 составила 4900 ед./мг. В табл. 1 представлены этапы очистки ФЛА2 и активности препарата фосфолипазы А2 на различных этапах выделения.

Для оценки стабильности разработанных протоколов выделения ФЛА2 была проведена проверка воспроизводимости методов хроматографического разделения ФЛА2 (рис. 5а и 5б). Полученные данные свидетельствуют о высокой стабильности результатов.

Раствор очищенного препарата фосфолипазы А2 обладал активностью не менее 14 тыс. ед./мл

при чистоте по белку более 90%. По этим показателям наш препарат ФЛА2 превосходит все имеющиеся коммерческие препараты, а также аналитические препараты, полученные другими авторами, в том числе в *P. Pastoris*. Это дает основания полагать рациональным масштабирование данного метода получения фермента.

В работе представлен метод очистки рекомбинантной ФЛА2, включающий в себя концентрирование при тангенциальном фильтровании, отделение от большинства белковых примесей на сорбенте Sepharose Q Fast Flow и финальную доочистку, и концентрирование на сорбенте Butyl-Sepharose

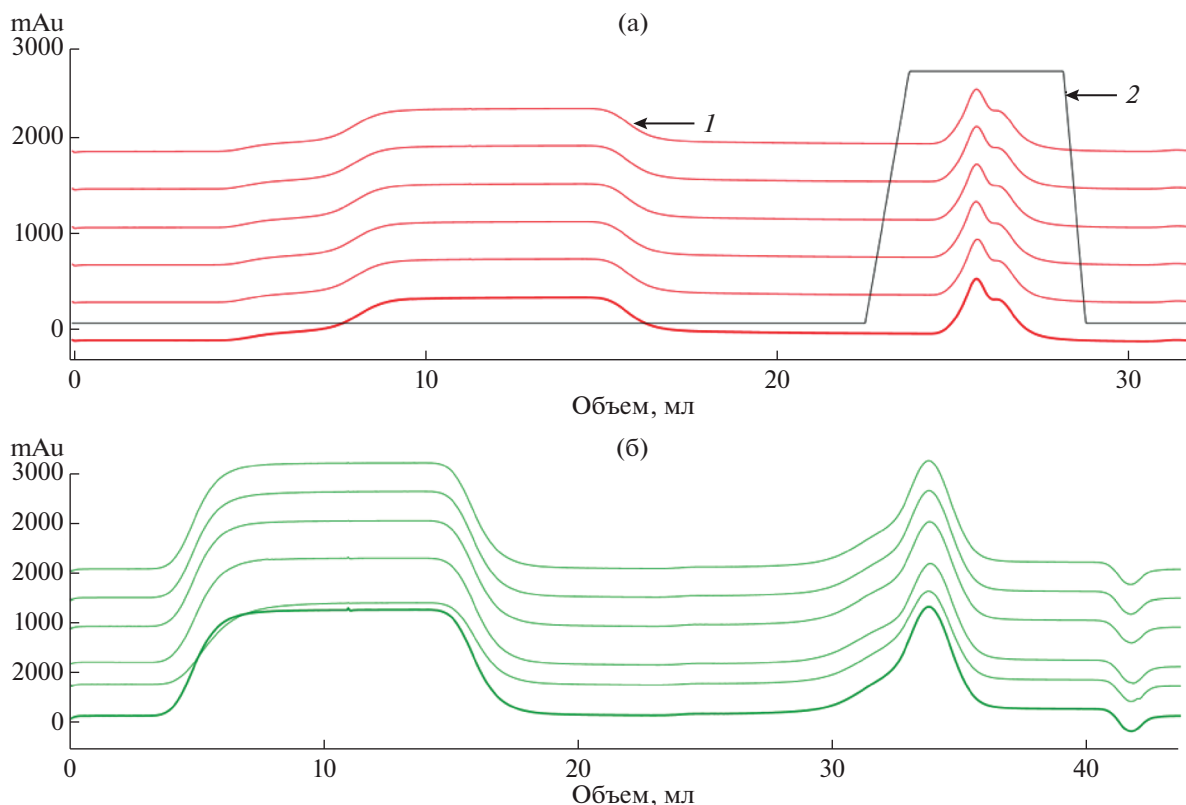


Рис. 5. Воспроизводимость анионообменной хроматографии при очистке ФЛА2 на сорбенте HiTrap Q XL (а) и хроматографии гидрофобных взаимодействий на Butyl-Sepharose FF (б). 1, 2 – профиль элюции белка и градиент NaCl соответственно.

Fast Flow, позволяющий получать высокоочищенный фермент (~90%) с концентрацией не менее 2.5 мг/мл и удельной активностью 4900 ед./мг белка.

Полученные результаты воспроизводимости методов хроматографического разделения ФЛА2 дают основание считать разработанный протокол получения высокоочищенной ФЛА2 приемлемым для масштабирования.

Определение ферментативной активности ФЛА2 и культивирование *P. pastoris* были проведены при содействии сотрудников Центра коллективного пользования "ФИЦ Биотехнологии" РАН.

Результаты получены при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках выполнения работ по соглашению от 31.05.2018 г. № 14.607.21.0207 (УИН RFMEFI60718X0207), ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aloulou A., Ali Y.B., Bezzine S., Gargouri Y., Gelb M.H. Phospholipases: an Overview, Lipases and Phospholipases. New York: Springer, 2012. P. 63–85.
2. Osipov A.V., Filkin S.Y., Makarova Y.V., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. // Toxicon. 2010. V. 55. № 2–3. P. 186–194.
3. Sugiyama M., Ohtani K., Izuhara M., Koike T., Suzuki K., Imamura S., Misaki H. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. № 22. P. 20051–20058.
4. Van den Bergh C.J., Bekkers A.C., De Geus P., Verheij H.M., De Haas G.H. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 170. № 1–2. P. 241–246.
5. Kramer R.M., Hession C., Johansen B., Hayes G., McGray P., Chow E.P., Tizard R., Pepinsky R.B. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 10. P. 5768–5775.
6. Stadel J.M., Jones C., Livi G.P., Hoyle K., Kurdyla J., Roshak A., McLaughlin M.M., Pfarr D.A., Comer S., Strickler J. // J. Mol. Recognit. 1992. V. 5. № 4. P. 145–153.
7. Matoba Y., Kumagai T., Sugiyama M. // J. Inorg. Biochem. 2000. V. 82. № 1–4. P. 221–223.
8. Liu A., Yu X.-W., Sha C., Xu Y. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2015. V. 175. № 6. P. 3195–3206.
9. Yu X.-W., Sun W.-H., Wang Y.-Z., Xu Y. // Sci Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 16249.
10. Yu D., Ma Y., Jiang L., Walid E., He S., He Y., Xiaoyu Z., Zhang J., Hu L. // J. Oleo Sci. 2014. V. 63. № 1. P. 25–30.
11. Radvanyi F., Jordan L., Russo-Marie F., Bon C. // Anal. Biochem. 1989. V. 177. № 1. P. 103–109.
12. Matsui T., Kamata S., Ishii K., Maruno T., Ghanem N., Uchiyama S., Kato K., Suzuki A., Oda-Ueda N., Ogawa T., Tanaka Y. // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 2330.

Scalable Method for Expression and Purification of Recombinant Secretary Phospholipase A2 in Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*

S. Y. Filkin^{a,*}, N. V. Chertova^a, A. A. Zenin^a, A. V. Lipkin^a, E. G. Sadykhov^a, and A. N. Fedorov^a

^aFederal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia

*e-mail: s.filkin@fbras.ru

Received May 14, 2019; revised June 03, 2019; accepted June 20, 2019

The phospholipase A2 from *Streptomyces violaceus* was expressed in the methylophilic yeast *Pichia pastoris*. A scalable method for high yield purification of recombinant phospholipase A2 was developed. Functional active phospholipase A2 was purified and can be used for the industrial application.

Keywords: phospholipase A2, methylophilic yeast, *Pichia pastoris*