

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт

Базовая кафедра биотехнологии
кафедра

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

_____ Т. Г. Волова
подпись

« _____ » _____ 2020 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01.Биология

Получение высокочистых препаратов биотинилированной *in vivo* люциферазы

Metridia для аналитического применения

тема

Руководитель _____
подпись, дата

_____ с.н.с., к.б.н.

С. В. Маркова

Выпускник _____
подпись, дата

А. В. Кохановская

Красноярск 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений	3
Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	6
1.1 Общая характеристика люциферазы <i>Metridia longa</i> как биолюминесцентного репортера.....	6
1.3 Авидин/стрептавидин-биотиновая система и ее практическое применение..	9
1.4 Природное биотинилирование белков в живых клетках	12
1.5 Минимальный субстрат для биотин-протеин лигазы и биотин-акцепторные пептиды	14
1. 7 Применение биотинилированных белков.....	17
Глава 2. Материалы и методы.....	19
2.1. Материалы	19
Глава 3. Результаты эксперимента и обсуждение	30
3.1 Получение конструкций для биотинилирования <i>in vivo</i>	30
3.2 Определение растворимости полученных конструкций при синтезе в клетках <i>E. Coli</i>	36
3.3 Очистка телец включения, содержащих рекомбинантный белок. Оптимизация процесса их растворения.	37
3.4 Оптимизация условий рефолдинга рекомбинантного белка. Оценка кинетики в различных условиях.	38
3.5 Отработка очистки рефолдированного белка хроматографией.....	40
3.6 Характеризация полученных высокочистых препаратов люциферазы с биотинакцепторным пептидом.	45
Выводы	47
Список используемых источников.....	48

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BPL – биотин протеин лигаза (биотин-холоэнзим синтетаза)

BCCP – биотин-карбоксил-переносящий белок

MLuc – люцифераза копепод *Metridia longa*

РСА – анализ комплементации белковых молекул

AviTag – минимальный субстрат для биотин-протеин лигазы

PCR – Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота

а /к – аминокислота

мл – миллилитр, 10^{-3} л

мкл – микролитр, 10^{-6} л

М – концентрация, моль / литр

mM – миллимоль / литр, 10^{-3}

фмоль – фемтомоль, 10^{-15} моль

нм – нанометр, $1 * 10^{-9}$ метров

bp – пара нуклеотидов

кДа – килодальтон, 1000 а.е.м

ВВЕДЕНИЕ

Люциферазы из морских копепод *Metridia longa* относятся к семейству небольших секретлируемых протеинов, осуществляющих окисление субстрата-целентеразина, сопровождающееся выделением энергии в виде видимого голубого света $\lambda=485$ нм [29], при этом кинетика свечения происходит по типу «вспышка» с быстрым затуханием в течение нескольких минут [6].

В настоящее время изоформы секретлируемой люциферазы копепод *Metridia longa* широко применяются в качестве биолюминесцентных репортеров в различных исследованиях и успешно использовались для анализа *in vitro* [6] и *in vivo* в клетках млекопитающих [29, 30], благодаря их высокой биолюминесцентной активности, простоте запускаемых реакций, высокой чувствительности, а также широкому линейному диапазону измерений.

При использовании ферментативных меток в качестве визуализирующего репортера, широко применяется (стрепт)авидин-биотиновая система, основанная на чрезвычайно высоком сродстве биотина к белкам стрептавидину и авидину [2, 28]. Очень высокое специфическое сродство биотина к (стрепт)авидину является основой для разработки систем, используемых в иммуноанализах для обнаружения и количественного определения веществ [40].

Биотинилирование в живых клетках достаточно редкая модификация, в клетках *E. coli* биотинилируется лишь один белок – биотин-карбоксил-переносящий белок (ВССР), являющийся природным субстратом для присоединения биотина [10, 11]. Присоединение биотина к целевому белку осуществляется биотин протеин лигазой (BPL), которая в клетках *E. coli* кодируется геном *birA* [8].

При исследовании субстратной специфичности BirA из *E. coli* методом фагового дисплея и случайного подбора консенсусных пептидов было выбрано несколько эффективных биотин-акцепторных пептидов, которые по количеству аминокислотных остатков были в разы меньше природного ВССР. Так, на основе одного из эффективно биотинилировавшихся *in vivo* пептидов №85 была

выявлена минимальная последовательность для биотин-протеин лигазы BirA из 15 аминокислотных остатков – GLNDIFEAQKIEWHE (№85-11, обозначенный далее Avi-Tag), служащая эффективным субстратом благодаря его неизменно высокой степени биотинилирования [5, 36]. Некоторые белки, генетически слитые с последовательностями таких искусственных биотин-акцепторных пептидов, были успешно биотинилированы по специфическому аминокислотному остатку-лизину *in vivo* при экспрессии в клетках *E. coli* [5].

Использование связывания биотин-меченых белков со стрептавидином, в силу чрезвычайно высокоаффинного и специфического взаимодействия нашло применение в широком спектре биологических применений [12], включая иммуноанализ, метод фагового дисплея и аффинную очистку [43], количественный анализ масс-спектрометрии (МС) [16], идентификацию белков, подвергающихся посттрансляционной модификации (PTM) [13], а также для иммобилизации различных белковых молекул [37,43].

Цель работы: Получение высокочистых препаратов биотинилированной *in vivo* люциферазы Mluc из *Metridia longa* для аналитического применения.

Основными задачами данной работы являлись:

- 1) Создание генно-инженерных конструкций для высокоэффективного биотинилирования *in vivo* люциферазы *Metridia longa* в виде фьюжина люциферазы и ее мутанта с биотин-акцепторным пептидом Avi-Tag в экспрессионном комплексе с геном биотин-лигазы Δ BirA через слабое стоп/старт перекрывание TGATG на основе экспрессионной плазмиды pET22b+.
- 2) Анализ экспрессии полученных конструкций в клетках *E. coli*.
- 3) Разработка методики очистки полученных рекомбинантных белков из телец включения.
- 4) Оптимизация условий фолдинга рекомбинантных белков.
- 5) Получение и характеристика высокочистых препаратов люциферазы с биотинакцепторным пептидом.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика люциферазы *Metridia longa* как биолуминесцентного репортера

Люциферазы из морских копепод *Metridia longa* представляют собой небольшие секретируемые белки размером ~18,4–24,3 кДа, включая отщепляемый секреторный пептид [31]. Биолуминесцентные системы морских копепод относятся к люциферазному типу и являются кофактор независимыми монооксигеназами, так как в реакции участвуют только люцифераза, низкомолекулярный субстрат целентеразин, в отношении которого люциферазы копепод показали узкую специфичность [30, 40], и молекулярный кислород [2].

В данных ферментативных реакциях люциферазы копепод катализируют окислительное декарбоксилирование целентеразина, сопровождающееся выделением энергии в виде видимого голубого света $\lambda=485$ нм (Рис. 1).

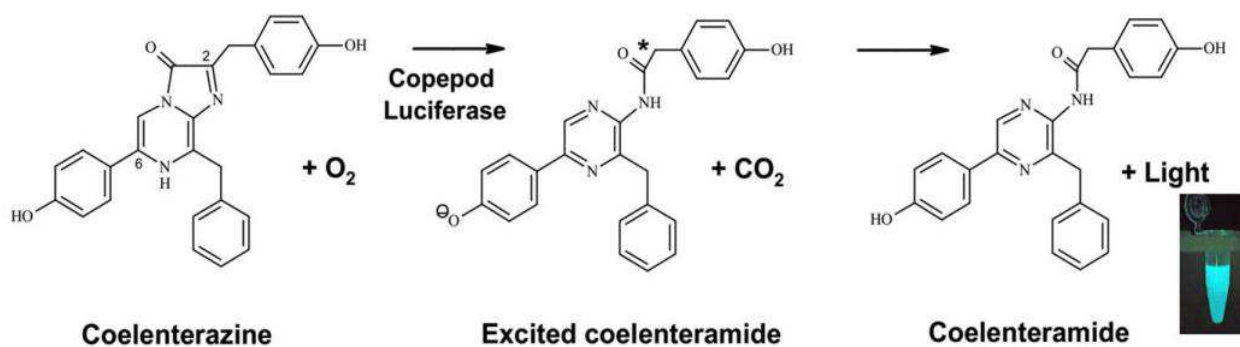


Рисунок 1 – Схема биолуминесцентной реакции окислительного декарбоксилирования целентеразина, катализируемого люциферазами копепод [31]

В оптимальных условиях кинетика свечения происходит по типу «вспышка» (flash) с быстрым затуханием в течение нескольких минут [6, 41]. Однако в ряде исследований, использующих люциферазу копепод в качестве репортерного белка, важно иметь биолуминесцентный сигнал стабильный в течение десятков минут, что может быть получено за счет изменения условий измерения активности люцифераз [2].

Люцифераза *MLuc* из копепод *Metridia longa* является одним из самых перспективных биолюминесцентных репортёров, так как обладает целым рядом неоспоримых преимуществ:

- относительно небольшой размер, например, изоформа *MLuc7* является самой маленькой, из всех известных, природной люциферазой – 16,5 кДа [32]
- широкий линейный диапазон обнаружения, составляющий примерно около шести порядков, с нижним пределом обнаружения до ~ 1 фмоля
- линейная корреляция светового сигнала люциферазы и ее концентрации, что сообщалось многими исследователями [32, 18]
- простая кофактор-независимая реакция, требующая лишь наличия субстрата, и высокая биолюминесцентная активность [31]
- экстремально высокая термостабильность, активность люциферазы, сохраняющей активность даже при нагреве до 100°C [1; 31], а также ее долговременная стабильность.

Все вышеперечисленное также было подтверждено при исследованиях люциферазы в качестве репортера для анализа *in vitro* [6], в котором была подтверждена ее высокая чувствительность и стабильность при термической обработке, химических модификациях и хранении.

1.2 Аналитическое применение люциферазы *Metridia longa* как биолюминесцентного репортера

В настоящее время секретируемые изоформы люциферазы копепод *Metridia longa* широко применяются в качестве биолюминесцентных репортеров в различных исследованиях и успешно используются для анализа *in vitro* [6] и *in vivo* в клетках млекопитающих [29, 30].

К таким исследованиям относятся анализ комплементации белковых фрагментов (РСА), иммунологические анализы, технологии высокопроизводительного скрининга, а также *in vivo* неинвазивная биолюминесцентная визуализация (Рис. 2) [31].

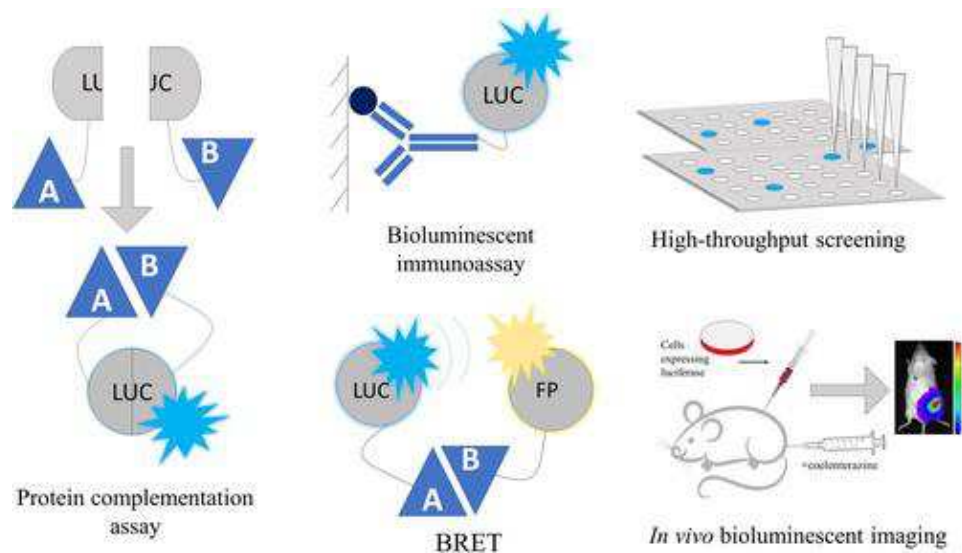


Рисунок 2 – Схематическое представление основных областей аналитического применения люциферазы копепод [31]

Использование билюминесцентных белков в качестве меток обеспечивает высокую чувствительность обнаружения аналита в различных анализах связывания [15, 38] и возможность многократного наблюдения внутриклеточных процессов *in vivo* в реальном времени без разрушения клеток и тканей [1]. Данное свойство широко применяется в иммуноанализах, при использовании сконструированных белков MLuc, соединённых с антителами или их фрагментами, обладающими антигенсвязывающими функциями [44].

Визуализация *in vivo* с использованием билюминесцентных белков, позволяет неинвазивным и нетоксичным способом контролировать процессы в интактных клетках и моделях мелких животных. [4]. Что позволяет осуществлять непосредственный мониторинг и количественную оценку биологических процессов с использованием аликвот культуральной среды, крови и других жидкостей организма [29, 7].

Применение биоаналитических систем на основе билюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET), полученных на основе люцифераз, слитых с флуоресцентными белками, излучающих в красной области спектра, где живые ткани поглощают минимально, может значительно улучшить глубокую тканевую оптическую визуализацию *in vivo* благодаря лучшему проникновению длинноволнового света. Данная технология основана на

резонансной передаче энергии от донора (люциферазы) к акцепторному флуоресцентному белку, поглощающего энергию донора и излучающего свет на большей длине волны [39].

Высокопроизводительный скрининг (HTS) является основным методом получения различных лекарственных препаратов и исследования множественных взаимодействий клеточных белков. Так, на основе репортера люциферазы MLuc, были проанализированы более девяти тысяч низкомолекулярных соединений в исследовании по поиску критических агентов [33]. Были разработаны системы скрининга HTS-формата для исследований микроРНК. Таким способом были идентифицированы микроРНК, ингибирующие ДНК репарацию и сенсibilизацию опухолевых клеток [17].

Методом PCA (Protein-fragment complementation assay) в настоящее время проводится большое количество исследований, связанных с белок-белковым взаимодействием [29, 23]. Метод PCA основан на слиянии комплементарных фрагментов репортерного белка с двумя предполагаемыми взаимодействующими белками, в результате чего происходит прямое обнаружение белковых взаимодействий путем формирования функционально активного репортера [29].

1.3 Авидин/стрептавидин-биотиновая система и ее практическое применение

(Стрепт)авидин-биотиновая система основана исключительно на высоком сродстве белка авидина и стрептавидина к биотину, состоящего из имидазольного и тетрагидротиофенового кольца, боковая цепь которого представлена валериановой кислотой (Рис. 3) [28].

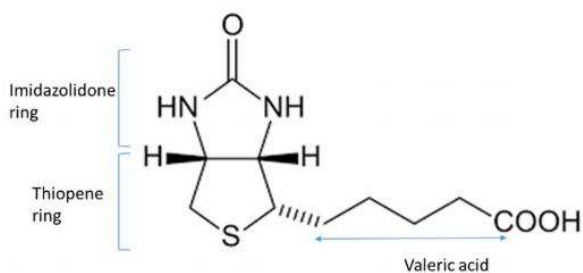


Рисунок 3 – Химическая структура биотина [28]

Авидин и стрептавидин, являются структурно и функционально аналогичными белками, вторичные, третичные и четвертичные структуры которых удивительно похожи [26]. Авидин является гликопротеином, состоящим из четырех идентичных субъединиц, каждая из которых связывает молекулу биотина (Рис. 4). Оказалось, что связывание биотина изолированным мономером авидина характеризуется относительно низкой константой сродства $\sim 10^7 \text{ M}^{-1}$, тогда как константа тетрамера значительно выше $\sim 10^{15} \text{ M}^{-1}$.

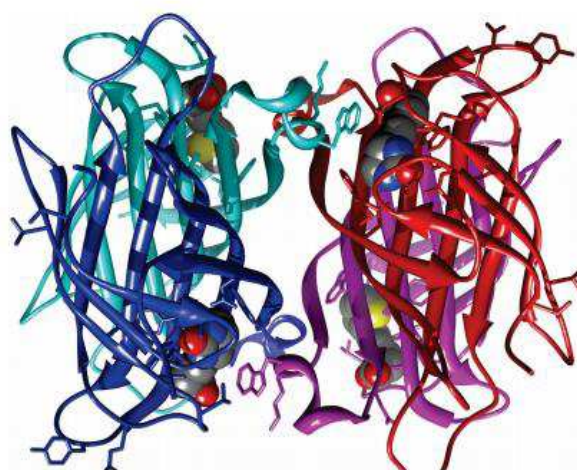


Рисунок 4 – Структура тетрамера авидина, мономеры которого связаны с 4 молекулами биотина [19]

Стрептавидин также является биотин-связывающим белком, содержащим четыре независимых биотин-связывающих сайта [19, 45]. Однако, сравнивая две системы, авидин – биотиновый комплекс представляет собой самое высокое взаимодействие сродства, известное в природе, между белком и лигандом, константа сродства составляет $1.7 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$, тогда как у стрептавидин-биотинового комплекса константа сродства – $2.5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ [14].

Присоединение биотина к различным молекулам называется "биотинилированием", которое играет важную роль в различных аналитических методах исследования белка, таких как локализация-взаимодействие, очистка, иммобилизация, а также для высокочувствительной детекции различных белковых молекул [28].

Специфичность взаимодействия между биотином и (стрепт)авидином является основой для разработки систем, используемых в иммуноанализах,

анализа гибридизации ДНК, иммуногистохимии и проточной цитометрии для обнаружения и количественного определения веществ [40]. В основе данных методов лежит взаимодействие антигена с антителом, визуализация которых происходит благодаря присоединению биотинилированного фермента, в качестве средства обнаружения, к (стрепт)авидину, который имеет сайты связывания биотина, при этом сам (стрепт)авидин соединен с антителом, которое необходимо обнаружить [19].

Существует несколько основных конструкций иммуноанализа, на основе повышенной чувствительности (стрепт)авидин-биотинового взаимодействия:

1) В системе LAB (labeled avidin–biotin) (стрепт)авидин маркируются флуоресцентным веществом, а биотин, присутствующий в другом реагенте (антитело, нуклеотид, белок), связывает молекулу-мишень с системой маркировки (Рис.5).

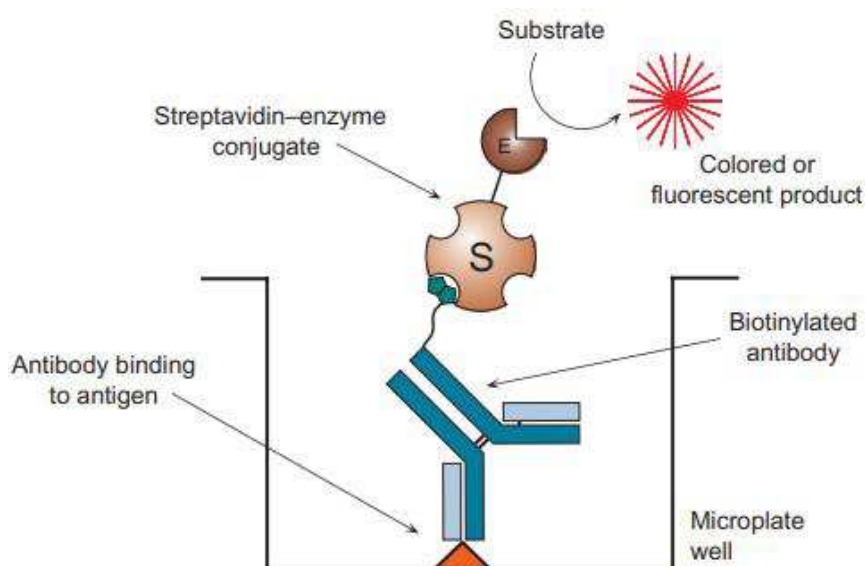


Рисунок 5 – LAB конструкция анализирующей системы [19]

2) Система BRAB (bridged avidin–biotin) содержит множество (стрепт)авидин биотин-связывающих сайтов. При этом (стрепт)авидин используется немаркированным и служит связующим элементом для биотинилированного фермента (Рис. 6)

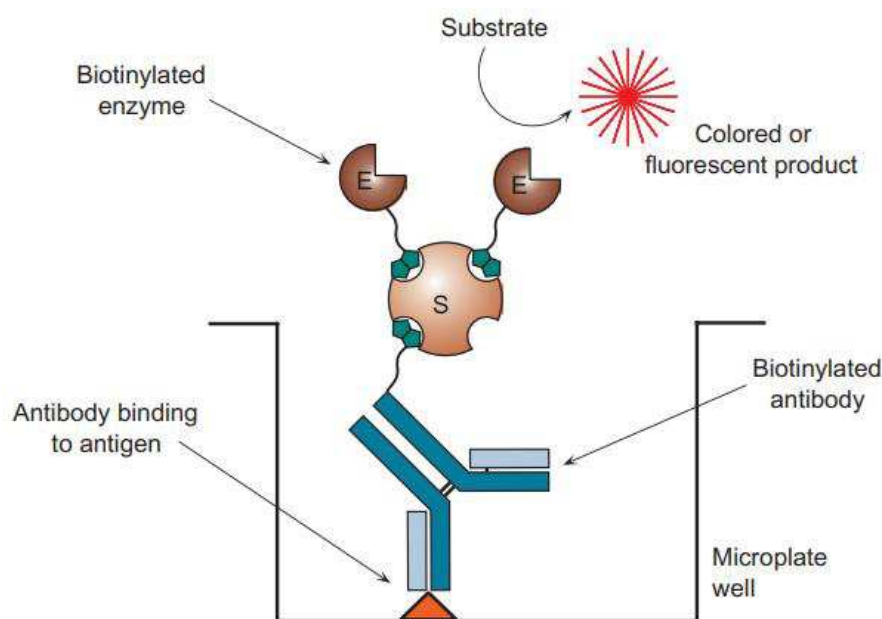


Рисунок 6 – BRAB конструкция анализирующей системы [19]

3) Система ABC (avidin–biotin complex) сочетает в себе принципы двух предыдущих систем, путем формирования полимера биотинилированного фермента и (стрепт)авидина, имеющего несколько сайтов связывания, что создает связующую матрицу для формирования комплекса [19, 12].

Также (стрепт)авидин-биотиновая система широко используется для локализации и визуализации раковых клеток и нацеливания различных препаратов и радионуклидов на опухоли [14].

1.4 Природное биотинилирование белков в живых клетках

В живых клетках биотинилируется обычно небольшое количество белков, от одного до пяти, это относительно редкая модификация. Например, в клетках *E. coli* биотинилируется лишь один белок – биотин-карбоксил-переносящий белок (BCCP), являющийся субъединицей ацетил-СоА – синтетазы, тогда как другие бактерии могут содержать от одного до трех биотинилируемых белков [10, 11].

Ферментом, отвечающим за присоединение биотина к белкам, является биотин-протеин лигаза (BPL), также известная как биотин-холоэнзим-синтетаза. BPL катализирует посттрансляционное формирование амидной связи между карбоксильной группой биотина и ϵ -аминогруппой специфического лизинового

остатка белка. Как показали генетические исследования, большинство организмов имеют лишь один BPL фермент, способный присоединять биотин к белкам [8].

Первой биотин протеин лигазой, структура которой была полностью изучена, является BirA из *Escherichia coli*. BirA представляет собой ассиметричный белок массой 35,5 кДа, который состоит из трех доменов: N-терминальный ДНК-связанный домен, центральный каталитический домен и C-терминальный домен (Рис. 7).

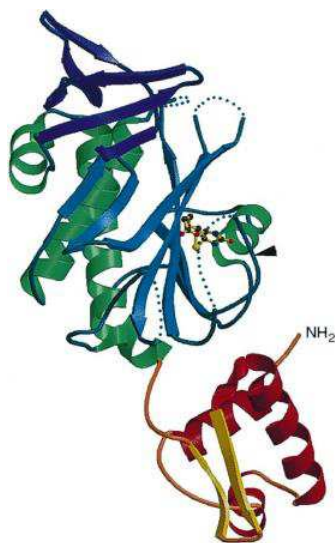


Рисунок 7 – Строение многофункционального белка BirA [10]

В клетках *E. coli* BirA является бифункциональным белком, который может служить как транскрипционным репрессором биотин-синтетазного оперона (*bio*), так и ферментом, ответственным за биотинилирование белка.

Биотинилирование белка достигается с помощью консервативного двухступенчатого механизма реакции, который катализируется биотин протеин лигазой (BPL) во всех организмах. В первой частичной реакции биотин и АТФ необходимы для образования биотинил-5'-АМР (holo) связанной формы лигазы, которая служит одновременно и реакцией промежуточного звена для биотинилирования белка и корепрессором для транскрипционной регуляции.

При небольшом клеточном спросе на биотин holo-BirA может димеризовать и связывать ДНК, где она функционирует как транскрипционный репрессор биотин-синтетазного оперона (*bio*), тем самым подавляя синтез

биотина. Напротив, в присутствии субстрата, требующего биотинилирования, holo-BirA действует как биотин-лигаза, которая распознает и связывается с биотин-карбоксил-переносящем белком (ВССР), содержащим остаток лизина, предназначенный для биотинилирования (Рис.8) [35]

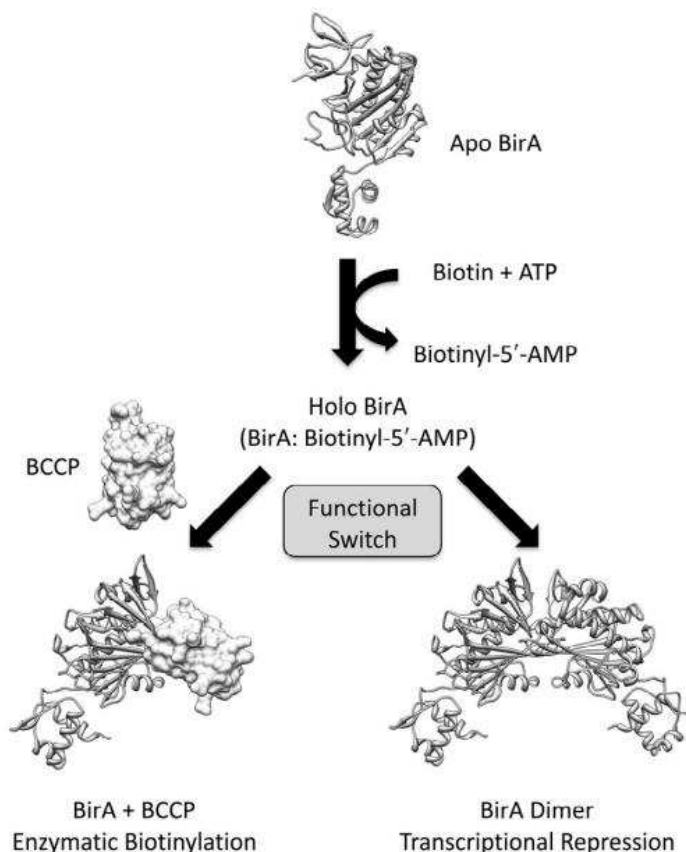


Рисунок 8. Бифункциональная BirA в клетках *E. Coli*

Биотинилирование белка - это пример посттрансляционной модификации, которая выполняется с изысканной специфичностью, например, биотин-лигаза *E. coli* (BirA) модифицирует только один из >4000 различных белков в бактериальной клетке [10].

1.5 Минимальный субстрат для биотин-протеин лигазы и биотин-акцепторные пептиды

Рядом исследований было показано, что BirA из *E. Coli* способна биотинилировать целевые субстраты, полученные из различных организмов, начиная от бактерий и заканчивая растениями и человеком. Изучение первичных биотинилируемых субстратов, полученных из ряда организмов, указывают на некоторую гомологию последовательности, особенно в области специфического

аминокислотного остатка - лизина. В этих структурах остаток лизина находится в β -повороте, что делает его доступным для действия биотин протеин лигазы [5].

Анализ усечения природного биотин-карбоксил-переносящего белка (ВССР), являющегося единственным биотинилирующимся субстратом в клетках *E. Coli*, показал минимальный субстрат 87 аминокислот [27].

В дальнейшем, при изучении субстратной специфичности BirA удалось идентифицировать пептид, состоящий из 23 аминокислотных остатков (Рис. 9), который в дальнейшем при слиянии с N-терминальным концом мальтоза-связывающего белка, выступал как субстрат, идентичный природному ВССР в реакции биотинилирования, хоть и не имел большого сходство с ним. Всего 4 остатка в позициях -2, -3, -4 и +2, относительно целевого остатка-лизина в пептиде, также обнаруживаются с относительно высокой частотой в природном субстрате ВССР.

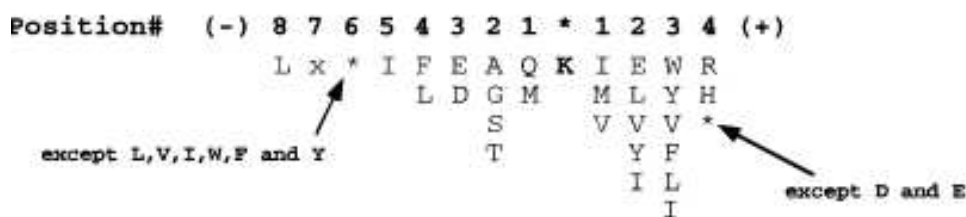


Рисунок 9 – Аминокислотные последовательности, являющиеся субстратами для BirA в реакциях биотинилирования, полученные при скрининге четырех пептидных библиотек

Затем проведя ряд усечений 23 мерного пептида был получен минимальный субстрат, состоящий из 14 аминокислотных остатков. Полученный субстрат намного меньше последовательности, необходимой для природного субстрата – не менее 75 аминокислотных остатков и может функционировать на любом конце слитого белка, что позволяет активно использовать данный белок, в качестве акцепторного пептида в реакциях биотинилирования [5; 36].

1.6 Биотинилирование белков *in vivo* при синтезе рекомбинантного белка в клетке

В настоящее время для биотинилирования рекомбинантных белков широко применяются минимальные биотин-акцепторные пептиды, которые

были получены при исследовании субстратной специфичности BirA из *E. coli* методом фагового дисплея и случайного подбора консенсусных пептидов. Было показано, что эффективность присоединения биотина в полученных усеченных пептидах была практически идентична для всех белков. На основе одного из эффективно биотинилировавшихся *in vivo* пептидов №85 была выявлена минимальная последовательность для биотин-протеин лигазы BirA из 15 аминокислотных остатков – GLNDIFEAQKIEWHE (№85-11, обозначенный далее Avi-Tag), служащая эффективным субстратом благодаря его неизменно более высокой степени биотинилирования [5; 36].

При соединении целевых белков с минимальным пептидом Avi-Tag и дальнейшей экспрессии фрагмента *in vivo*, совместно с BirA, они могут биотинилироваться в клетках бактерий, дрожжей, насекомых и млекопитающих. Кроме того, при слиянии рекомбинантного белка с пептидом Avi-Tag и дальнейшей инкубации полученного фрагмента с очищенной биотин протеин лигазой-BirA, рекомбинантные белки могут быть эффективно биотинилированы на центральной остаток лизина в аминокислотной последовательности пептида Avi-Tag.

На сегодняшний день существует несколько вариантов получения биотинилированных белков в лабораторных условиях. Если белок хорошо экспрессируется в клетках *E. coli*, то, необходимо сконструировать рекомбинантную ДНК, в которой его кодирующая область слита с Avi-Tag на его N - или C-концевом участке, при этом до 100% молекул будут маркированы биотином на одном остатке лизина [21]. Подробная схема присоединения биотина к биотин-акцепторному пептиду Avi-Tag представлена на Рис. 10. В качестве альтернативы, при достаточном количестве белка, его можно химически биотинилировать, но тогда получается гетерогенный препарат с различной степенью биотинилирования и различными биотинилированными лизинами, который требует последующей очистки.

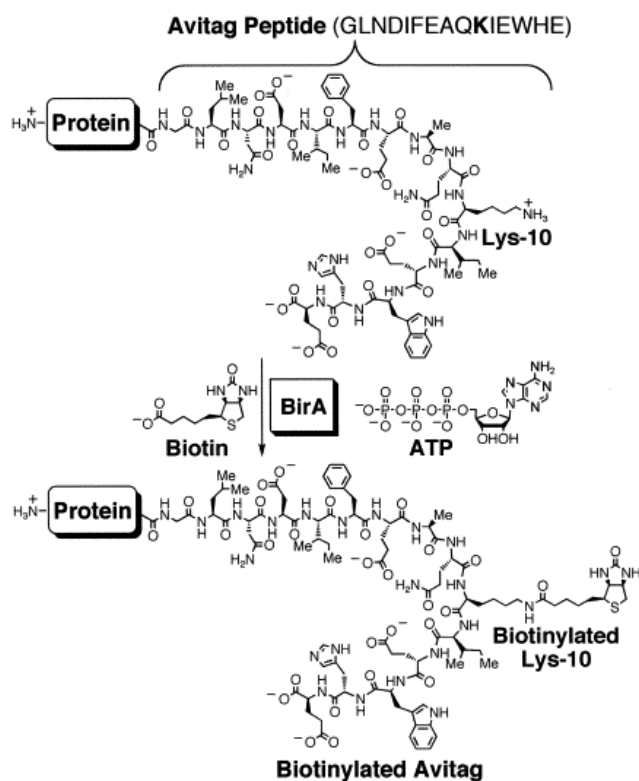


Рисунок 10 – Схема присоединения биотина к биотин-акцепторному пептиду Avi-Tag [3]

1. 7 Применение биотинилированных белков

За последние два десятилетия использование биотин-меченых белков, в силу чрезвычайно высокоаффинного и специфического взаимодействия с авидином и стрептавидином, нашло применение в широком спектре биологических применений [12], включая иммуноанализ, метод фагового дисплея, основанный на аффинном отборе, для анализа белок–белковых, белок–РНК и белок–ДНК взаимодействий и аффинную очистку [43].

Биотинилированные иммунодоминантные белки-антигены широко используются в иммуноферментных анализах (ELISA) для выявления специфических к заболеванию антител в жидкостях организма предполагаемых пациентов [43]. Однако иммобилизация этих белков на поверхности пластин ИФА может быть затруднена и неэффективна.

Недавние исследования показали, что использование покрытой стрептавидином поверхности для равномерной и эффективной иммобилизации биотин-меченых белков, является одним из способов, позволяющих эффективно иммобилизовать различные белки в смеси, независимо от того, что они

представляют собой, при этом сохраняя их конформацию, что имеет большое преимущество над традиционными подходами к иммобилизации белков, предполагающих их пассивную адсорбцию на полистирольных поверхностях, приводящую к денатурации белка [37, 43].

Одно из протеомных применений (стрепт)авидин-биотиновой системы включает в себя идентификацию белков, подвергающихся посттрансляционной модификации (PTM) [13]. Таким образом, например, был идентифицирован процесс обратимого O-гликозилирования внутриклеточных белков, который является известным регуляторным механизмом *in vivo* белковых функций [23].

Не менее важный вклад технология биотин-меченых белков внесла в количественный анализ масс-спектрометрии, который является важным диагностическим инструментом, поскольку изменения в клетке часто вызывают изменения в экспрессии белка. Однако сравнение идентичных белков из разных пробегов масс спектрометрического (МС) анализа затруднено из-за колебания сигнала [13]. Для решения данной проблемы на основе биотин-меченых белков был разработан механизм со встроенным кодированием, количественного сравнения белка в разных белковых образцах в одном МС-прогоне [16, 34], при этом белки, соответствующие различным клеточным состояниям, были помечены разными масс-кодируемыми биотиновыми метками.

В медицине биотин-меченые белки в виде конъюгатов используются, главным образом, для локализации и визуализации раковых клеток и для локальной доставки лекарственных препаратов и радионуклидов на опухоли [14, 13].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

При создании конструкций Avi-ML7/ Δ BirA и Avi-ML7mut/ Δ BirA были использованы следующие составляющие элементы: экспрессионный вектор pET22b+, фрагменты ДНК: Avi-ML7, Avi-ML7mut и Δ birA.

Клетки *E. coli*: штамм XL1-Blue для клонирования и BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL для экспрессии.

Таблица 1 – Олигонуклеотиды для создания конструкций

№	Последовательность (5'→3')
852	CGCAGAAGATCGAGTGGCATGAAGGCGGATCCAATGATGTTAACCGTGG
853	CGCACATATGGGTCTCAACGACATCTTTGAGGCGCAGAAGATCGAGTGG
854	GTTTAGCATTAAGTAACTGGATCATCAGCCAGCAAGACCSTTGAT
855	ATCAAGGGTCTTGCTGGCTGATGATCCAGTTACTTAATGCTAAAC
856	TTGTTCGAGTCATTATTTTCTGCACTACGC

Используемые ферменты: эндонуклеазы рестрикции NdeI («Sibenzyme», «BioLabs») и XhoI («BioLabs»), высокоэффективная T4 ДНК лигаза («BioLabs»), полимеразы Pfu-turbo («Stratagene»), Taq-полимераза («Sibenzyme»).

Условия работы с ферментами описаны в руководствах, предоставленных фирмами изготовителями («Sibenzyme», «Stratagene» и «BioLabs»).

Наборы для очистки ДНК фирмы QIAGEN: «QIAquick PCR Purification Kit» и «QIAquick Gel Extraction Kit».

Маркеры молекулярного веса «1 kB DNA Ladder» и «100 bp ladder».

В работе были использованы следующие реактивы: ампициллин, IPTG (изопропил- β -D-тиогалактопиранозид) («Sigma»), CaCl₂, NaCl, Трис, Бис-Трис-пропан, мочевины, ЭДТА-натриевая соль («Sigma»), ДТТ («Aldrich»), целентеразин («MolProbs»), бычий сывороточный альбумин («Sigma-Aldrich»), агароза, легкоплавкая агароза («Bio-Rad»), агар бактериологический, 80% изопропанол, 96 % этанол.

Для электрофореза белковых образцов использовали акриламид, бис-акриламид, ТЕМЕД, персульфат аммония («Bio-Rad»), набор стандартных маркерных белков («Serva»).

Таблица 2 – Состав буферных растворов и сред

Название	Состав:
LB-среда	10 г/л бакто-триптона («Difco»), 5 г/л дрожжевого экстракта («Sigma»), 7.5 г/л NaCl, pH 7.0
LB-агар	15 г/л агара («Difco») в LB-среде
SOC-среда	20 г/л бакто-триптона («Difco»), 5 г/л дрожжевого экстракта («Sigma»), 0.5 г/л NaCl, 20 мМ глюкоза; pH 7.5
ТАЕ буфер	0.04 М Трис-ацетат; 0.02 М ЭДТА pH 8.0
ЕВ буфер	набор Wizard plus SV minipreps DNA purification system, «Promega»
ТЕ буфер	10 мМ Трис-НСl pH 8,0; 1 мМ ЭДТА pH 8,0
NEB4 буфер	50 мМ ацетат калия, 20 мМ Трис-ацетат, 10 мМ ацетат магния, 1 мМ ДТТ
ТФВ буфер	10 мМ КСl, 45 мМ $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 10 мМ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 3 мМ $NaCoCl_2$, 10 мМ К-MES, pH 6.2
Pfu -Turbo буфер	200 мМ Трис-НСl, 100 мМ КСl, 100 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 20 мМ $MgSO_4$, 1 mg nuclease-free BSA, 1% Triton X-100
Лигазный буфер	50 мМ Трис-НСl pH 7.8, 10 мМ $MgCl_2$, 25 мкг/мл BSA, 1 мМ АТФ, 10 мМ ДТТ
Буфер для ДНК электрофореза	0,25% бромфеноловый синий, 0,25% ксилоцианола, 30% глицерин
Лизирующий буфер (г/ф в ПААГ)	50 мМ Трис-НСl pH 6.8, 2% SDS; 10% глицерин; 50 мМ дитиотреитол (ДТТ) 5% β-меркаптоэтанол; 0,25% бромфеноловый синий
Буферы для выделения плазмидной ДНК:	

№1 буфер	50 mM глюкоза, 25 mM Трис-НСl, рН 8,0, 10 mM ЭДТА
№2 буфер	0,2 M NaOH, 1% SDS
№3 буфер	3 M NaOAc, рН 4,75

2.2 Методы

2.2.1 Синтез первого фрагмента: **AviTag-ML7-2C** и **AviTag-ML7mut-2C** методом полимеразной цепной реакции

В состав ПЦР-реакции на общий объем 50 мкл входили следующие компоненты: 40 мкл H₂O, 5 мкл буфера (10X PfuUltra Stratage buffer), 1мкл ДНК полимеразы (PfuSE, 5U/ μl), 0,5мкл 20 mM dNTP, 0,5 мкл образца ДНК, по 1,5 мкл 10 mM праймеров (5' праймер №852 и 3' праймер №854)

2.2.2 Синтез второго фрагмента: **ΔVirA-I64** через перекрывание-TGATG методом полимеразной цепной реакции

В состав ПЦР-реакции на общий объем 50 мкл входили следующие компоненты: 40 мкл H₂O, 5 мкл буфера (10X PfuUltra Stratage buffer), 1мкл ДНК полимеразы (PfuSE, 5U/ μl), 0,5мкл 20 mM dNTP, 0,5 мкл образца ДНК, по 1,5 мкл 10 mM праймеров (5' праймер №855 и 3' праймер №856)

Параметры ПЦР реакции:

95°C – 45 сек	} 17 циклов
94°C – 20 сек	
49°C – 30 сек	
72°C – 1 мин	
72°C – 6 мин	

Где 95°C – температура денатурации ДНК, 49°C – температура отжига праймеров, 72°C – элонгация ДНК

2.2.3 Очистка ПЦР-фрагментов с помощью «QIAquick PCR purification kit»

50 мкл продуктов ПЦР переносили в 5 объемов РВ буфера-250 мкл в 1,5 мкл пробирки, перемешивали на вортексе. Смесь переносили в колонки QIAgene и центрифугировали 1 мин (10000-15000 об/мин), проходящий сквозь колонку раствор сливали. Далее делали промывание сорбированной ДНК. Для этого наносили на колонку 500 мкл буфера PE, инкубировали 3 мин, затем центрифугировали 1 мин (12000 об/мин), оставшуюся жидкость сливали. После этого делали второе промывание сорбированной ДНК. Для этого наносили на колонку еще 250 мкл буфера PE, инкубировали 3 мин и затем центрифугировали 2 мин (12000 об/мин), оставшуюся жидкость сливали. Колонку с промытой ДНК сразу помещали в чистую 1.5 мл пробирку. Сушили на воздухе 15 мин. Далее в центр фильтра с ДНК капали 50 мкл элюионного буфера EB (10 mM Tris-HCl pH 8.5) with 1 mM EDTA, инкубировали 3 мин и затем центрифугировали 2 мин (12000 об/мин). ДНК через колонку элюировала с буфером в пробирку.

2.2.4 Реакция слияния

Реакция слияния проводилась на общий объем 50 мкл. В нагретую воду 250 мл до 94°C, опускали пробирки со смесью: 5 мкл буфера (10X PfuUltra Stratage buffer), 15 мкл фрагмента Δ VirA-I64 и 5 мкл фрагмента AviTag- Δ ML7-C2, очищенных через колонку QIAgene (аналогично для фрагмента AviTag-ML7mut-2C). Далее остужали воду с пробиркой в ней до 30°C, добавили в пробирку 20 мкл H₂O, 1 мкл 20 mM dNTP, 1 мкл ДНК полимеразы (PfuSE, 5U/ μ l) Затем проводили синтез в термоциклере аналогично программе, указанной выше, при этом был добавлен цикл 72°C в течении 30 сек перед началом денатурации белка, а также увеличена температура отжига праймеров до 53°C. После окончания ПЦР добавляли праймеры: 1,5 мкл 5' праймер №853 и 3' праймер №856, повтор всех циклов ПЦР реакции.

2.2.5 Синтез фрагмента крайними праймерами 853/856

Синтез фрагмента проводился в общем объеме 50 мкл. В состав смеси входили: 35 мкл H₂O, 5 мкл буфера (10X PfuUltra Stratage buffer), 5 мкл фрагмента Avi- Δ ML7- Δ VirA, 1 мкл 10 mM dNTP, далее добавляли по 1,5 мкл

праймеров (5' праймер №853 и 3' праймер №856), 1 мкл ДНК полимеразы (PfuSE, 5U/ µl). Затем проводили синтез в термоциклере.

2.2.6 Получение липких концов для клонирования – препаративная рестрикция

Препаративная рестрикция проводилась в общем объеме 60 мкл. К 47, 8 мкл фрагмента Avi-ML7/ΔBirA добавили 6 мкл буфера (10x PfuUltra Stratage buffer), 1,5 мкл BSAx50, эндонуклеазы рестрикции (3 мкл XhoI и 2 мкл NdeI), затем инкубировали 2 часа при 37°C.

2.2.7 Приготовление вектора pET22b+ (NdeI – XhoI) для клонирования

а) Рестрикция вектора pET22b+

К 50 мкл плазмиды pET22b+ добавили 6,2 мкл буфера NEB2x10, 1,2 мкл BSAx50 и эндонуклеазы рестрикции (2 мкл XhoI и 2 мкл NdeI). Далее инкубировали в течение 2 часов при 37°C. Результаты были проверены с помощью агарозного гель-электрофореза.

б) Дефосфорилирование вектора

Через 2 часа рестрикции плазмидную ДНК обработали 1 мкл щелочной фосфатазы CIP (NEB, 10 U/ µl) для дефосфорилирования 5'-концов, затем снова инкубировали в течение 1 часа при 37°C.

в) Очистка рестрикционных фрагментов ДНК

Фрагменты ДНК: вектор pET22b+, вставки Avi-ML7/ΔBirA и AviTag-ML7mut/ΔBirA разделяли в геле методом агарозного электрофореза без добавления бромистого этидия в TAE буфере при рабочем напряжении 40 В. Далее вырезали часть геля, содержащую фрагмент ДНК нужной длины.

2.2.8 Выделение ДНК вектора pET22b+ и вставки Avi-ML7/ΔBirA из агарозного геля с помощью «QIAquick gel extraction kit»

Взвесили вырезанные полоски геля, которые содержат нужную нам ДНК. Для расплавления геля, необходим двойной объем буфера QG к одному объему фрагмента геля. После полного расплавления в гель вносили изопропанол, финальная концентрация которого должна составлять 20% (т.е. четвертая часть

общего объема геля). Затем образцы прогоняли через колонки в несколько заходов, центрифугируя по 1 мин (15000 об/мин), сливая проходящую через пробирки жидкость. Далее в колонку добавляли 500 мкл буфера QG и центрифугировали 1 мин (15000 об/мин). Затем добавляли 500 мкл буфера PE, инкубировали в течение 3 мин, центрифугировали 1 мин (13000 об/мин). После этого добавляли 250 мкл буфера PE, инкубировали 3 мин, центрифугировали 3 мин (13000 об/мин). Колонки вставили в чистые пробирки. Образцы сушили на воздухе 15 мин. Далее вносили 30 мкл буфера EB (10 mM Tris-HCl pH 8.5, 1mM EDTA). Инкубировали 3 мин. Центрифужные мини-колонки были помещены в новые пробирки, далее центрифугировали при максимальных оборотах. При центрифугировании ДНК образцов элюирована буфером в пробирки.

2.2.9 Агарозный ДНК электрофорез

Для разделения образцов ДНК использовали 1% агарозный гель в TAE буфере. Рабочее напряжение при электрофорезе составляло 100В. В гель и буфер был добавлен интеркалирующий краситель – бромистый этидий (EtBr) до конечной концентрации 1 мкг/мл. Концентрацию ДНК оценивали визуально по флуоресценции бромистого этидия. Размер фрагмента определяли по расстоянию, пройденному фрагментом в геле, используя стандартные маркеры молекулярного веса «1 kV DNA Ladder» и «100 bp ladder». Анализ результатов проводили с использованием системы «AlfaImager».

2.2.10 Лигирование вектора pET22b+ (NdeI – XhoI) с фрагментом Avi-ML7/ Δ BirA (NdeI – XhoI)

Лигирование вектора с фрагментом проводилось с контролем, общий объем составил 40 мкл. Общая смесь содержала 28 мкл H₂O, 4 мкл буфера (T4-LigBufx10), 2 мкл T4 ДНК-лигазы, 2 мкл вектора pET22b+ (NdeI – XhoI), затем смесь была поделена на две пробирки. В контроль было добавлено еще 3 мкл H₂O, в другую пробирку добавили 3 мкл Avi-ML7/ Δ BirA (NdeI – XhoI). Реакцию проводили в течение 18 часов при 16°C. Далее провели инактивацию лигазной в течение 10 мин при 64°C.

2.2.11 Трансформация в клетки *E. coli*

Компетентные клетки XLI-Blue готовили в 40 мл LB-среды, в которую бактериологической петлей вносили колонию клеток *E. coli* штамм XLI-Blue. Клетки растили при температуре 37°C при интенсивном перемешивании до оптической плотности OD 0.6. Затем клетки разливали по 2 мл в пробирки, центрифугировали в течение 10 мин (3500 об/мин, 4°C). Среду сливали, в оставшиеся клетки добавляли 700 мкл TFB буфера, после чего клетки помещали в лед на 15 мин. Затем клетки снова центрифугировали в течение 2 мин, (5000 об/мин), супернатант сливали, в оставшиеся клетки вносили 200 мкл TFB.

Компетентные клетки брали в объеме 100 мкл клеток на 6 мкл ДНК (после лигирования) и инкубировали при 0°C 30 мин. Затем проводили heart-shock клеток в течение 45мин при 42°C, потом пробирку сразу помещали в лед на 2 мин. В стерильном боксе в пробирку добавляли 1:5 среды SOC (500мкл), затем клетки инкубировали 1 час при 37°C. Приготовили чашки с LB-агаром и ампициллином (200 мкг/мл), продезинфицировав их под УФ-светом в течение 20 минут. Суспензию после инкубации центрифугировали при 4°C (3500об/мин), затем 2/3 объёма среды сливали, в оставшемся объеме размешивали осадок клеток. Полученную суспензию высевали в чашки Петри, растирая шпателем до высыхания, клетки растили в термостате при 37°C в течение суток.

2.2.12 Быстрый скрининг колоний PCR

Прокаленной и остуженной петлей снимали часть колонии с агара и переносили в 200 мкл пробирку с 10 мкл H₂O. Далее готовили mix смесь в общем объеме 20 мкл. Общая смесь содержала: 5.5 мкл H₂O + 10 мкл H₂O, что в пробирке, 2 мкл буфера (x10 Tag buff), 0.8 мкл 20 mM dNTP, 0.7 мкл праймеров (10 mM 5' праймер №37 и 10 mM 3' праймер №38), 0.7 мкл Tag polymerase (5U/мкл). Добавляли mix смесь в раствор с клетками.

Параметры ПЦР реакции:

95°C – 30 сек	} 25 циклов
94°C – 20 сек	
51°C – 30 сек	
72°C – 1. 2 мин	
72°C – 7 мин	
4 °C – 30 мин	

Результаты были проверены с помощью агарозного геля электрофореза.

2.2.13 Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli* штамма XLI-Blue щелочным лизисом на колонках QIAGEN.

Вырастили ночную культуру клеток *E. coli* штамм XLI-Blue в ~ 6 мл LB-среды, содержащей антибиотик (концентрация 200мкг/мл). Центрифугировали в 2 мл пробирках несколько раз при 8000 об/мин 2 мин. Ресуспендировали осадок в 500 мкл буфера P1 на вортексе. Добавляли 500 мкл буфера №2 (Lysis solution), мягко перемешивали до полной прозрачности раствора. Затем добавляли 700 мкл буфера 3 (нейтрализующий раствор, Buffer N3-Neutralization buffer), мягко перемешивали, центрифугировали 10 мин (16000 об/мин). Супернатант по частям наносили на колонку для очистки плазмидной ДНК, центрифугировали 1 мин, проходящий сквозь колонку раствор выливали. Промывали сорбированную ДНК, нанося на колонку 500 мкл буфера РВ. Инкубировали 1 мин, центрифугировали 1 мин, проходящий сквозь колонку раствор выливали. Затем наносили на колонку 500 мкл буфера РЕ. Инкубировали 3 мин, центрифугировали 1 мин, проходящий сквозь колонку раствор выливали. Снова наносили на колонку 250 мкл буфера РЕ. Инкубировали 3 мин, центрифугировали 2 мин, проходящий сквозь колонку раствор выливали. Последнее промывание ДНК делали 200 мкл 70 % этанолом, центрифугировали 2 мин, проходящий сквозь колонку раствор выливали. Колонку с промытой ДНК вставляли в чистую 1,5 мл пробирку и сушили на воздухе 15 мин. Затем в центр

филтра с ДНК наносили 80 мкл элюиционного буфера с 1 mM EDTA, инкубировали 3 мин. При центрифугировании 2 мин ДНК образцов элюировала с буфером в пробирки.

2.2.14 Аналитическая рестрикция

К 6.5 мкл H₂O добавляли 1 мкл буфера NEB2x10, 0,2 мкл BSAx50 и эндонуклеазы рестрикции (0.4 мкл XhoI и 0.3 мкл NdeI). Далее инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Результаты были проверены с помощью агарозного гель-электрофореза.

2.2.15 Получение и промывка телец включения

Клетки E. coli, содержащие плазмиды, культивировали в 200 мл LB-среде с финальной концентрацией ампициллина 200 ng/ml и 100 ng/ml биотина при температуре 37 °C 220 об/мин, до оптической плотности (OD) ~ 1,2 при постоянном перемешивании. Индукцию лактозного оперона проводили добавлением в культуральную среду IPTG, в конечной концентрации 0,25 mM, после индукции культивирование проводили при 28 °C.

Клеточный осадок из 200 мл культуры ресуспендировали в 10 мл буфера (20 mM Трис-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA - раствор №1) и разрушали ультразвуком при 0°C (10 сек x 6 раз с прерываниями по 1,5 мин во льду). После центрифугировали (14000g (rcf), 20 мин) тельца включения последовательно промывали (при комн. t°=23)

1. 20 мл 0,1% Тритон X-100 (100 мкл) на растворе №1. Озвучивали (суспендировали осадок ультразвуком до однородной суспензии). Центрифугировали 20 мин при 14000, слили жидкость

2. 20 мл 1 M NaCl на растворе №1. Озвучивали (суспендировали осадок ультразвуком до однородной суспензии). Центрифугировали 20 мин при 14000 g, осадок телец включения использовали для дальнейшей работы.

2.2.16 Растворение телец включения и рефолдинг

Промытые тельца включения из 200 мл растворяли в 1мл: 4 M гуанидин-HCl (382 mg) + 5 mM EDTA при комнатной температуре в течении 1 часа, затем

центрифугировали 10 мин. при 14000 об/мин (осадок взяли на э/фореz), добавляли 40 mM 1 M Tris-HCl pH 8.3 + 15.4 mg сухого DTT и еще 2 часа растворяли, с периодическим перемешиванием.

Готовили рефолдинговый раствор в 30 мл: 20 mM Tris-HCl pH 7.0; 150 mM NaCl; 0.3 M аргинин, 0.02 % NP-40, 10 mM MgCl₂, 5 mM GSH, 0.5 mM GSSG, охлаждаем до 4°C, затем ставили его на магнитную мешалку. В рефолдинговый раствор по каплям вливали 1 мл растворенных телец включения, оставляли на 1 час при 4°C. Далее добавляли катализатор окисления цистеиновых остатков 5 мкл 1 M CuCl₂ (0.16 mM). Инкубация с перемешиванием не менее 3 часов, измерение активности белка проводили каждые 30 мин. Билюминесцентную активность белков измеряли с использованием люминометра (модель БЛМ-003, СКТБ «Наука», Красноярск). При достижении максимума активности, образец концентрировали на концентрационной ячейке Amicon-Ultra-15.

2.2.17 Хроматографическая очистка целевого белка

1) Обессоливание проводили на колонке 5 ml HiTrap desalting в буфере А: 20 mM Bis-Tris-propane pH 9.3, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.01% NP-40, 5% glycerol, 20 μM DTT.

2) Анионообменная хроматография anIEC на колонке 5 ml HiTrap Q HP в том же буфере, что и обессоливание (буфер А), скорость ~1 ml/min

3) Гель-фильтрация (SEC) на колонке «Sephadex75» в буфере SEC без детергента: 20 mM Tris-HCl pH 7,5- 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% glycerol, 20 μM DTT.

Промывка колонок проводилась буфером В: 20 mM Bis-Tris-propane pH 9.3, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.01% NP-40, 5% glycerol, 20 μM DTT

2.2.17 Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Состав белковых препаратов определяли путем электрофореза в 12.5% полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Лэммли [18].

Полиакриламидный гель, заливали в следующей последовательности:

1) Гель пробка: АА- 500 мкл, ТЕМЕД – 5 мкл, PSA 10%– 10 мкл.

Вносили в щель между двумя стеклами снизу и ждали застывания.

2) Разделяющий гель 12,5%: H₂O – 769 мкл, Buf В (Трис-НCl, 1М, рН 9.0) – 1407 мкл, AA – 150 мкл, SDS 10% – 37.5 мкл, TEMED – 7.5 мкл, PSA 10% – 15 мкл. Сверху сразу заливали водой, равномерно проводя носиком вдоль верхнего стекла, после образования явного разделения фаз и застывания геля воду слили.

3) Концентрирующий гель: H₂O – 500 мкл, Buf С (Трис-НCl, 0.5 М, рН 6.8) – 250 мкл, AA – 150 мкл, SDS 10% – 20 мкл, TEMED – 5 мкл, PSA 10% – 10 мкл.

Сразу вставляли гребенку, через 15 мин гребенку осторожно вытаскивали, кармашки промывали водой, при необходимости расправляли.

Готовый гель устанавливали в прибор, фиксировали, заливали буфером (TGB-buffer x4 (500мл): Tris – 6г, Glycine – 28г, SDS – 2г) так, чтобы был контакт геля и буфера.

Образцы, которые предварительно прокипятили в течение 3 мин, наносили специальным шприцом Hamilton, промывая его деионизированной водой после нанесения каждого образца. Далее запускали программу – 250 V, 10 mA (const), 300 Вт.

Окраску геля проводили следующим раствором: кумасси G-250–2 г, уксусная кислота – 45 мл, 50% этанол в воде – 454 мл, в течение 30 мин на водяной бане, периодически помешивая. Отмывку геля проводили 10% уксусной кислотой, 2 раза в течение 15 мин.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Получение конструкций для биотинилирования *in vivo*

Подробная схема клонирования фрагментов Avi- Δ ML7/ Δ BirA-I64 и фрагмента Avi-ML7mut/ Δ BirA-I64 в экспрессионный вектор pET22b+ представлена на Рис. 11.

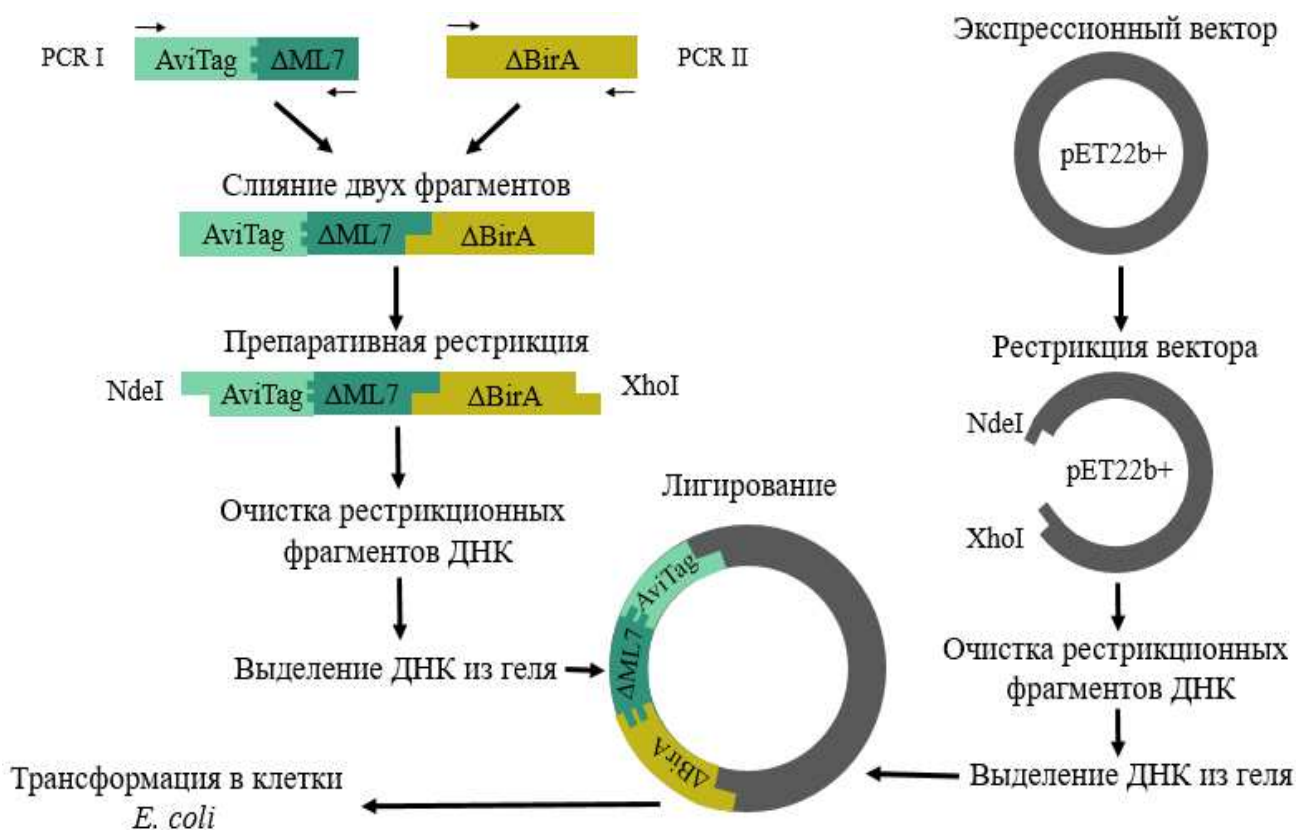


Рисунок 11 – Схема клонирования фрагмента Avi- Δ ML7/ Δ BirA-I64 и фрагмента Avi-ML7mut/ Δ BirA-I64 в экспрессионный вектор pET22b+

Синтез фрагмента Avi-ML7, кодирующего слитый белок люциферазы с биотин-акцепторным пептидом, состоящим из 15 аминокислотных остатков GLNDIFEAQKIEWNE (№85-11 или AviTag), был проведен в два этапа. Пептид №85-11 вместе с сайтом клонирования NdeI был закодирован в структуре двух форвардных (прямых) праймеров: №852 и №853 для гнездовой ПЦР и присоединен к N-концу изоформы люциферазы копепод *Metridia longa* - MLuc7, которая была укорочена на 2 а/к с C-конца (без потери активности). Синтез фрагмента был проведен методом полимеразной цепной реакции с

использованием специфических праймеров №852 и №854 (см. табл. 1), и далее при слиянии был использован 5'праймер №853 (см. табл. 1), кодирующий начальную часть пептида №85-11 вместе с сайтом клонирования NdeI. Синтез первого фрагмента Avi-ML7mut для второй конструкции проводился аналогичным образом, с использованием мутанта изоформы люциферазы *Metridia longa* - ML7mut, ранее полученный в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН. Результаты синтеза представлены на Рис. 12.

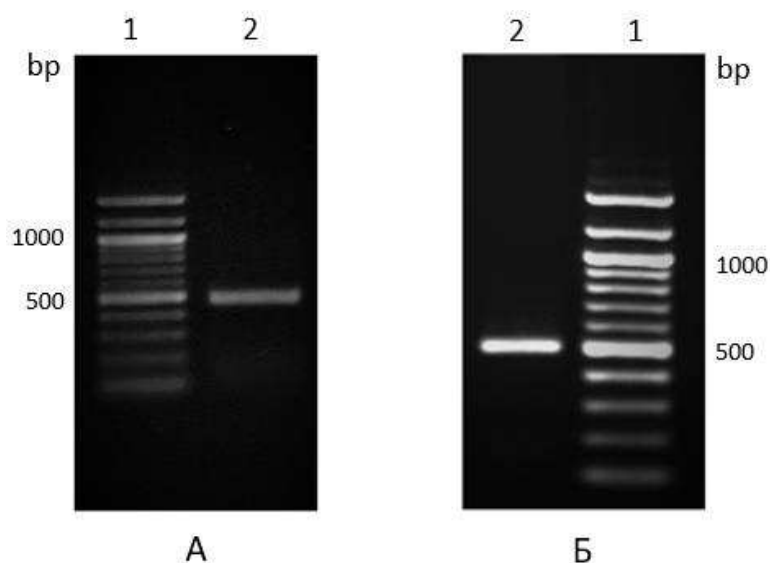


Рисунок 12 – Электрофореграмма амплифицированного фрагмента: А – фрагмент Avi-ML7mut; Б – фрагмент Avi-ML7; 1 – ДНК-маркер молекулярного веса 100 bp ladder; 2 – фрагменты

Синтез второго фрагмента Δ BirA был проведен с использованием праймеров, амплифицирующих укороченный с 5'-конца вариант гена Δ *birA* на 64 аминокислотных остатка, составляющих N-терминальный ДНК-связывающий домен, участвующий в процессе регуляции биотин-синтезирующего оперона *E.coli* [9, 10]. Синтез фрагмента был проведен методом ПЦР специфическими праймерами №855 и №856 (см. табл. 1). Последовательность *birA* гена была взята из опубликованного полностью расшифрованного генома *E.coli*, в качестве матрицы был использован клонированный в лаборатории фотобиологии ранее полноразмерный ген *birA*. Результаты синтеза представлены на Рис. 13.

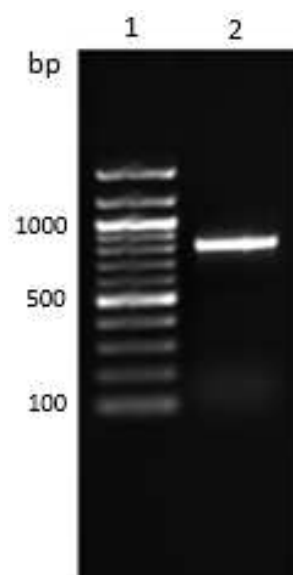


Рисунок 13 – Электрофореграмма амплифицированного фрагмента: 1– ДНК-маркер молекулярного веса 100 bp ladder; 2 – фрагмент Δ BirA

Полученные фрагменты для конструкций Avi-ML7 с Δ BirA, а также Avi-ML7mut с Δ BirA были соединены в процессе реакции слияния. Для гибридизации перекрывающихся концов был проведен отжиг синтезированных фрагментов: в эквимольном количестве в 20 мкл в 4х ПЦР-буфере сочетающиеся фрагменты были подвергнуты короткому нагреву до 94°C в течение 3 мин с последующим медленным охлаждением в течение 30 мин до температуры 30°C.

Затем были добавлены остальные компоненты реакции и смесь прогрета 5 мин при 72°C для проведения синтеза ДНК с использованием гибридизованных матриц. Далее проведена ПЦР 7 циклов без праймеров, затем добавлены крайние праймеры 3'праймер №856 и 5'праймер №853 (см. табл. 1) и проведено еще 7 циклов. Результаты реакции слияния представлены на Рис. 14.

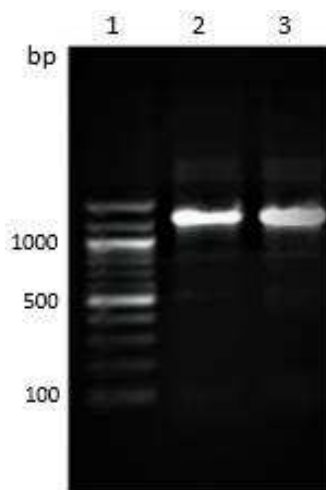


Рисунок 14 – Электрофореграмма реакции слияния двух фрагментов: 1– ДНК-маркер молекулярного веса 100 bp ladder; 2 – фрагмент Δ BirA+ Avi-ML7, 3 – фрагмент Δ BirA+ Avi-ML7mut

Далее синтезированные полноразмерные конструкции были очищены на колонках и подвергнуты препаративному расщеплению NdeI-XhoI для формирования липких концов с целью последующего клонирования в вектор.

После этого фрагменты ДНК: вектор pET22b+ и вставки Avi-ML7/ Δ BirA и Avi-ML7mut/ Δ BirA были очищены препаративным гель-электрофорезом в 1% агарозе. Данный метод разделения основан на разной скорости движения фрагментов ДНК разной длины. Фрагменты ДНК нужной длины были вырезаны из геля.

Синтезированные фрагменты Avi-ML7/ Δ BirA и Avi-ML7mut/ Δ BirA были клонированы в экспрессионный вектор pET22b+. Для сшивания ДНК-лигазой вектор и синтезированный фрагмент брали в молярном соотношении 1:2.

После трансформации лигазной смеси в клетки *E. coli* штамм XLI-Blue и посева клеток на селективную среду, содержащую ампициллин, выросло две колонии с экспрессионной конструкцией Avi-ML7mut/ Δ BirA и одна колония с экспрессионной конструкцией Avi-ML7/ Δ BirA. Методом быстрого скрининга колоний было выявлено, что трансформация экспрессионных конструкций прошла успешно во все трех клонах (Рис. 15).

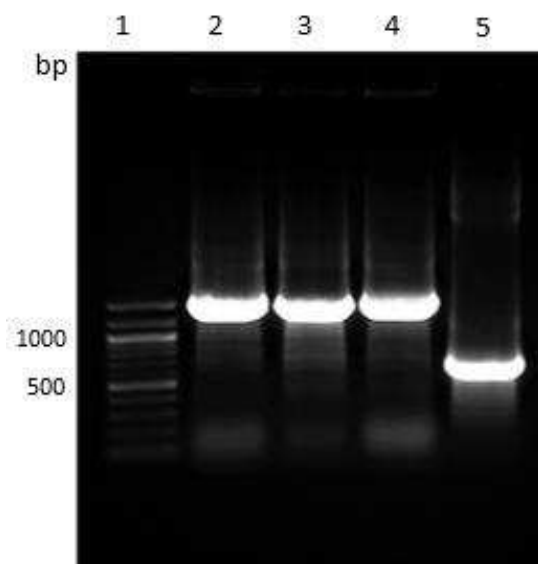


Рисунок 15 – Быстрый скрининг колоний *E. coli* штамма XL1-Blue: 1 – ДНК-маркер молекулярного веса 100 bp ladder; 2,3 – колонии с экспрессионной конструкцией Avi-ML7mut/ Δ BirA, 4 – колонии с экспрессионной конструкцией Avi-ML7/ Δ BirA; 5 – контроль

Далее была проведена еще одна процедура трансформации экспрессионных конструкций для увеличения количества клонов, в результате которой была получена еще одна колония с конструкцией Avi-ML7mut/ Δ BirA и две колонии с конструкцией Avi-ML7/ Δ BirA. Метод быстрого скрининга колоний уже не применяли, сразу выделили плазмидную ДНК из всех шести полученных клонов (Рис. 16) с помощью аналитических колонок («QIAGEN»).

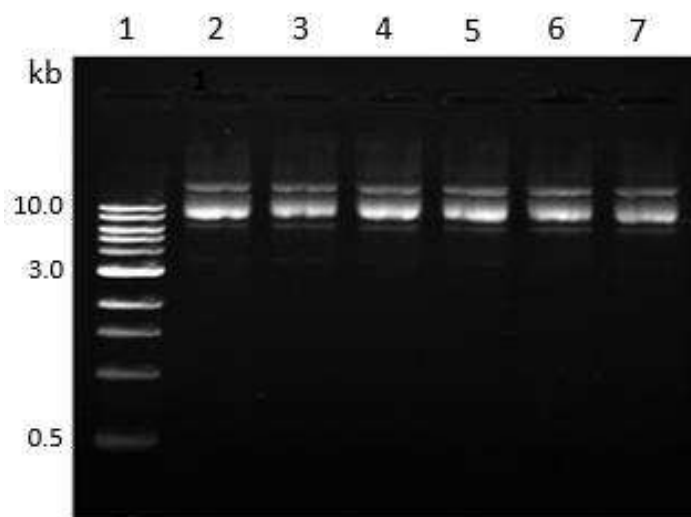


Рисунок 16 – Плазмидная ДНК полученных клонов. 1 – ДНК маркер молекулярного веса 1 kb NEB; 2,3,7 – плазмидная ДНК клонов с конструкцией Avi-ML7mut/ Δ BirA; 4,5,6 – плазмидная ДНК клонов с конструкцией Avi-ML7- Δ BirA.

Для анализа полученной плазмидной ДНК была проведена аналитическая рестрикция эндонуклеазами XhoI и NdeI, в результате которой было выявлено, что все клоны с экспрессионной конструкцией Avi-ML7mut- Δ BirA содержат запланированную вставку. Однако, наличие экспрессионной конструкции Avi-ML7/ Δ BirA в третьем и четвертом клоне, как показал анализ быстрого скрининга колоний, не подтвердилось аналитической рестрикцией и лишь шестой клон содержит запланированную вставку (Рис.17)

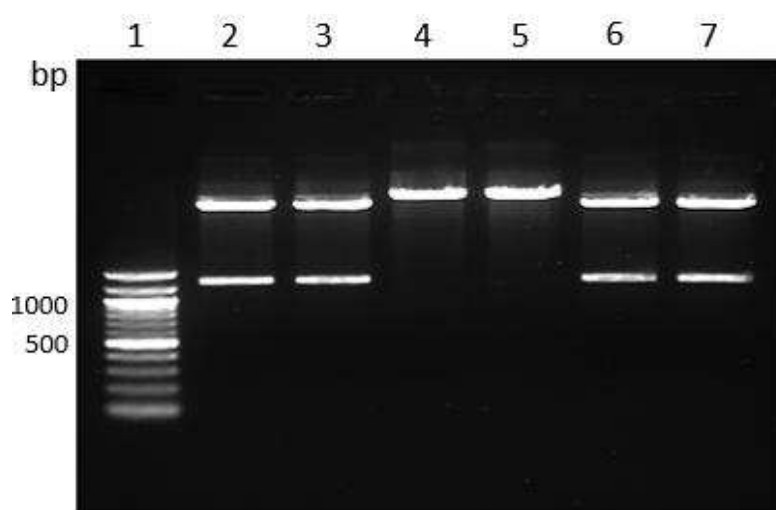


Рисунок 17 – Аналитическая рестрикция: 1 – ДНК-маркер молекулярного веса 100 bp ladder; 2,3,7 – плазмидная ДНК клонов с конструкцией Avi-ML7mut/ Δ BirA после рестрикции; 4,5,6 – плазмидная ДНК клонов с конструкцией Avi-ML7/ Δ BirA после рестрикции.

В дальнейшем, для проверки точности запланированных конструкций, плазмидная ДНК клонов №1,6 (дорожка 2,7), содержащих вставку Avi-ML7mut- Δ BirA, и ДНК клонов №3,5 (дорожка 4,6), содержащих вставку Avi- Δ ML7/ Δ BirA, была проверена секвенированием, выполненном в Центре коллективного пользования "Геномика" СО РАН на базе Института химической биологии и фундаментальной медицины (Новосибирск). Результаты секвенирования показали, что только конструкции клонов №1 (дорожка 2) и №5 (дорожка 6) полностью соответствовали запланированным. Полученные

конструкции Avi-ML7/ Δ BirA и Avi-ML7mut/ Δ BirA в дальнейшем будут обозначаться как конструкция №5 и №1 соответственно.

3.2 Определение растворимости полученных конструкций при синтезе в клетках *E. Coli*

Полученные плазмиды были трансформированы в экспрессионный штамм BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL для синтеза рекомбинантных белков. Оценка уровня экспрессии и анализ растворимости полученных конструкций, при синтезе в клетках *E. coli*, была проведена SDS-электрофорезом в ПААГ. Для анализа были взяты образцы клеток до индукции, после индукции синтеза IPTG, чтобы оценить уровень экспрессии, а также нерастворимая фракция (осадок) и супернатант, полученных после разрушения клеток ультразвуком и центрифугирования.

По электрофореграмме (Рис.18) можно оценить эффективность экспрессии наших целевых белков – появляющиеся полосы у индуцированных клеток на дорожках 2 и 5 приблизительно соответствуют размеру целевого белка 17,7 kDa. Также анализ показал, что в результате экспрессии целевой белок накапливался преимущественно в нерастворимой форме в виде телец включения - полосы на дорожках 4 и 7, отсутствующие на дорожках 3 и 6, на которых был нанесен супернатант.

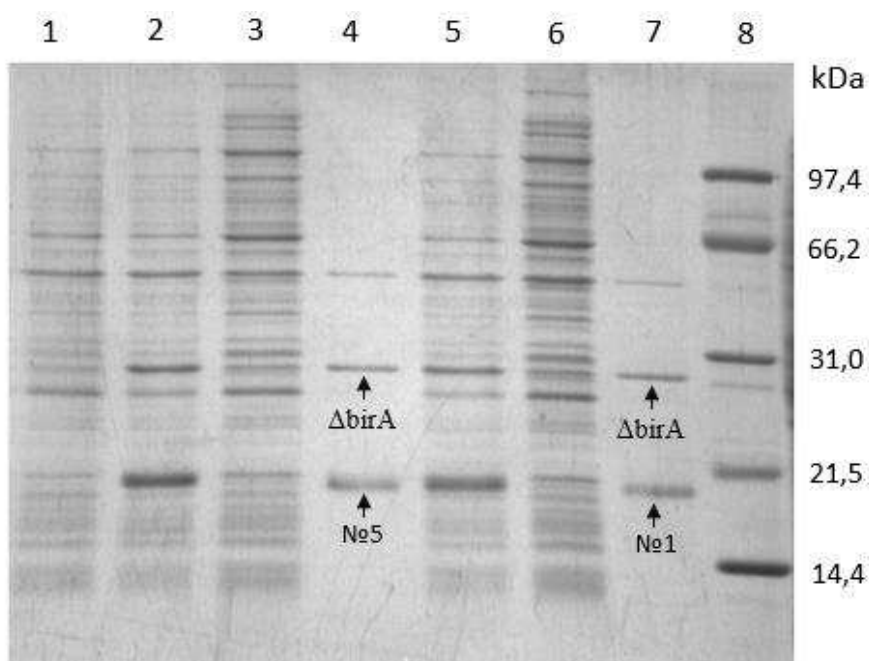


Рисунок 18 – Контроль экспрессии и растворимости полученных конструкций: 1 – клетки до индукции; 2 – целые клетки конструкции №5; 3 – супернатант конструкции №5; 4 – нерастворимая фракция конструкции №5 (осадок); 5 – целые клетки конструкции №1; 6 – супернатант конструкции №1; 7 – нерастворимая фракция конструкции №1 (осадок), 8 – маркеры молекулярного веса

Непредвиденным поворотом в работе стала идентификация предположительно *birA* (дорожки 4,7) в той же нерастворимой клеточной фракции (осадке), где находился наш целевой белок в виде телец включения. При этом наблюдается его неожиданно высокая экспрессия, хотя при планировании конструкций учитывалось, что последовательности, перекрывающиеся со сдвинутой рамкой считывания между двумя генами через стоп-старт перекрывание, транслируются отдельно и нижележащий белок экспрессируется в немного меньших количествах [26]. Стоп-старт перекрывание TGATG в 1 пару оснований гораздо менее эффективно для экспрессии второго гена, чем ATGA последовательность с перекрыванием в 2 пары оснований [20], соответственно, предполагали, что BirA будет синтезироваться в минимальном количестве.

3.3 Очистка телец включения, содержащих рекомбинантный белок. Оптимизация процесса их растворения.

Клеточный осадок из 200 мл культуры ресуспендировали в буфере, содержащем 20 mM Трис-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA. После разрушения ультразвуком тельца включения последовательно промывали (при комн. $t^{\circ}=23$) растворами, содержащими 0,1% Тритона X-100 и 0,9% NaCl, для удаления небелковых примесей, мешающих последующему рефолдингу белка. Результат промывки представлен на Рис.19 (дорожка 2).

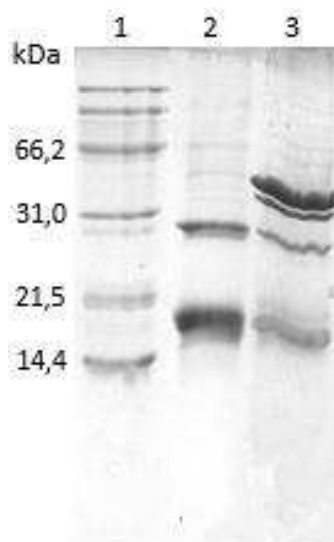


Рисунок 19 – Электрофореграмма очистки телец включения белка Avi-ML7: 1 – маркеры молекулярного веса, 2 – промытые тельца включения, 3 – осадок после 4 М гуанидина-НСl без Tris-НСl

В ходе работы были подобраны условия экстракции целевых белков с минимальными примесями из очищенных телец включения. Промытые ИВ было решено предварительно растворять в незабуференном 4 М гуанидин-НСl с 5 mM EDTA в течении 1 часа при комнатной температуре. Далее супернатант с целевым белком отделяли от осадка для дальнейшего растворения с добавлением 40 mM Tris-НСl pH 8.3 и 100 mM DTT в течение двух часов, с периодическим перемешиванием. Осадок был взят на анализ э/ф.

Как видно на электрофореграмме (Рис. 19) в кислом 4 М гуанидине-НСl остается нерастворенным существенное количество двух примесных клеточных белков, хотя и целевой белок Avi-ML7 также остается в небольшом количестве. Также, при таких условиях, остается нерастворенным и существенное количество примесного *birA*, о чем свидетельствует полоса в районе 30 kDa (дорожка 3). В результате, данные модификации позволили повысить чистоту белкового образца для следующих этапов очистки.

3.4 Оптимизация условий рефолдинга рекомбинантного белка. Оценка кинетики в различных условиях.

С целью оптимизации условий рефолдинга, были проведены модификации, призванные сместить окислительно-восстановительный баланс в

сторону окисления, для ускорения рефолдинга. Так было решено снизить молярную концентрацию дитиотреитола (DTT), который является сильным восстанавливающим агентом, до 50 mM, что в 2 раза меньше, чем использовали ранее. Также изменили соотношение окисленного глутатиона (GSSH) к его восстановленной форме (GSH) до 5:1 mM, повысив молярную концентрацию GSH в рефолдинговом растворе с 0.5 mM до 1 mM.

Как видно на Рис. 20, активность белка (рефолдинг №2), после вышеуказанных модификаций, сразу была очень высокой, быстрый рост наблюдался даже без добавления CuCl_2 , который используется в качестве катализатора для ускорения образования S-S связи. Возможно, необходимо доработать окислительно-восстановительный баланс, немного уменьшив окисленную часть, путем увеличения концентрации DTT и уменьшения концентрации GSSH.

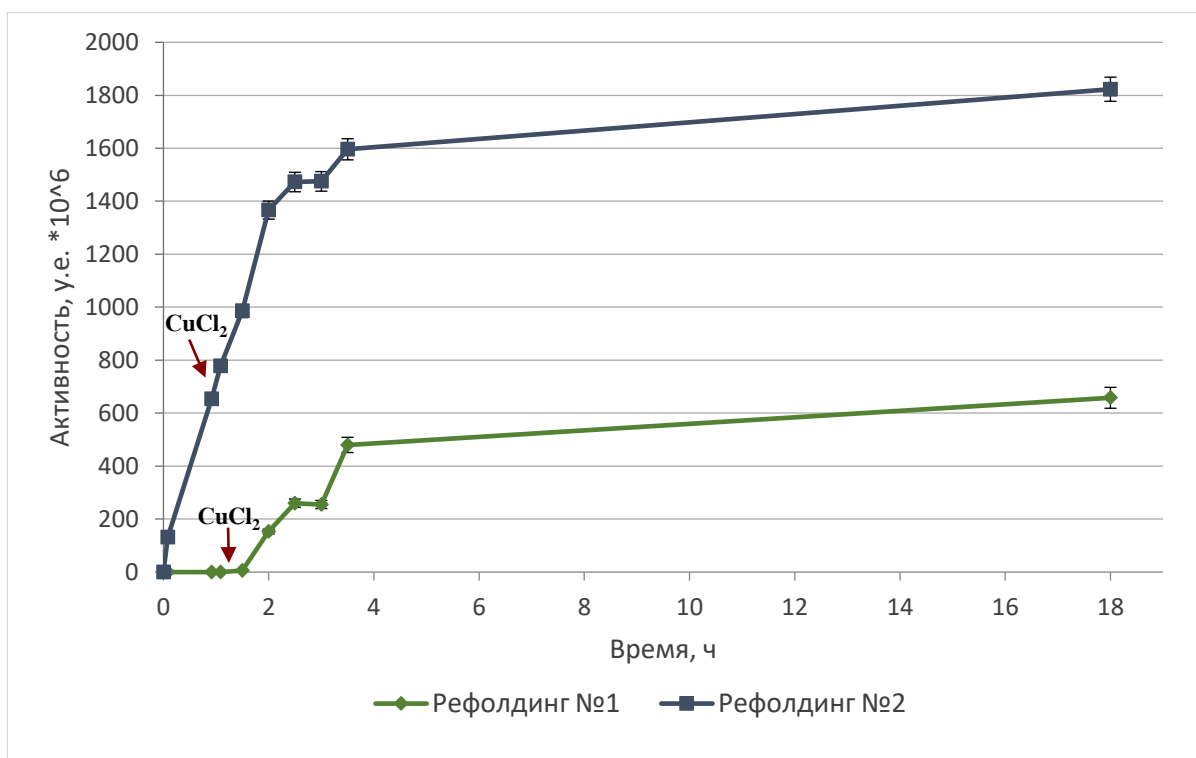


Рисунок 20 – Кинетика рефолдинга белка Avi-ML7mut в различных условиях: рефолдинг №1 - до модификаций, рефолдинг №2 - после модификаций

Данные модификации позволили повысить выход функционально активного рефолдированного белка, примерно в 2,8 раза, по сравнению с первоначальными условиями (Рис. 20). Возможно, это связано с тем, что

существенно был изменен окислительно-восстановительный баланс в сторону природного соотношения в эндоплазматическом ретикулуме, где, собственно, люцифераза *Metridia longa* и созревает перед секрецией.

3.5 Оработка очистки рефолдированного белка хроматографией

При подборе условий для проведения хроматографий учитывалось, что растворимость белка в изоэлектрической точке (pI) минимальна. Чтобы избежать выпадения белка в осадок, следовало выбирать pH буфера, сдвинутый относительно pI, не менее чем на 0,5 ед. Для хроматографии был использован буфер с pH 9.3, относительно pI, которая составила 8.06 и 8.05 соответственно для белков №1 и №5.

Перед нанесением рефолдированный белковый образец был предварительно сконцентрирован до 622 μ l. Как видно на электрофореграмме (Рис. 21), сконцентрированный белковый образец содержит большое количество примесных белков *E. coli*, в том числе *birA* (дорожки 2,3). Как оказалось, в осадок, образовавшийся после центрифугирования образца перед хроматографией, выпала и часть нашего целевого белка (дорожка 4).

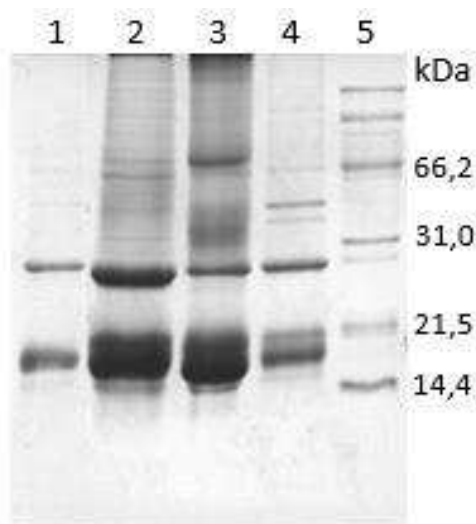
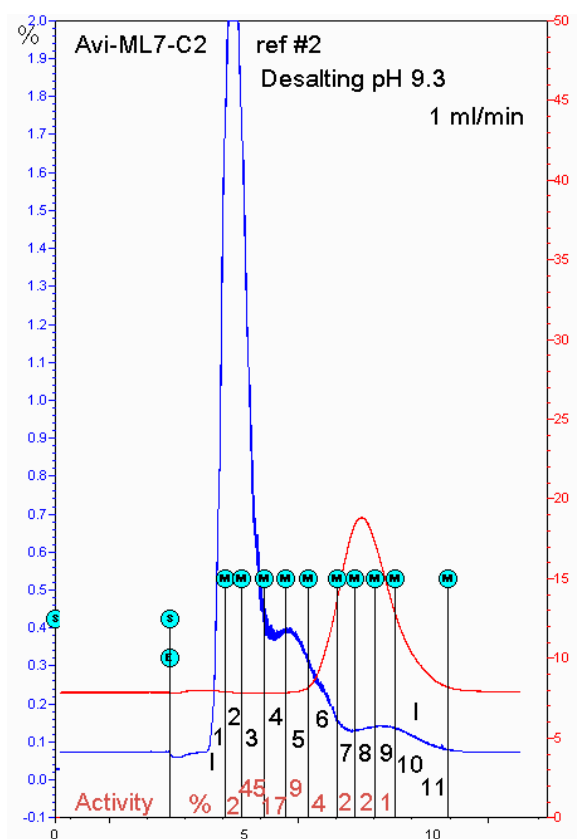


Рисунок 21 – Анализ рефолдированного белка для дальнейшей очистки хроматографией: 1- промытые тельца включения, 2,3 – конц. до 622 μ l Avi-ML7 (лизирующий и нативный буфер соответственно), 4 – осадок после ц/ф конц. до 622 μ l Avi-ML7, 5 – маркеры молекулярного веса

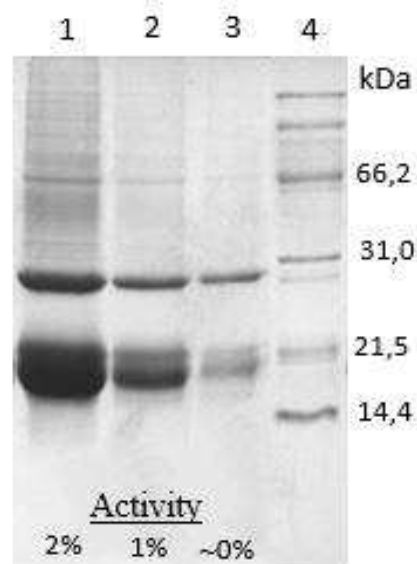
Обессоливание белков проводили на колонке 5 ml HiTrap desalting. На профиле элюции (Рис. 22А) виден большой белковый пик, который составил более 2 а.е., что вероятно связано с наличием примесного BirA. Анализ активности в собранных фракциях показал, что собрано 83% активности от нанесенной. Основная активность (79%) была сконцентрирована во фракциях №2–6, которые были взяты для дальнейшей очистки анионообменной хроматографией.

Фракции №7, №9 и №11, содержащие большое количество солей, были сконцентрированы для э/ф для идентификации содержимого. Данные фракции необходимо было проанализировать на наличие целевого белка, т.к. еще 5% активности (Рис. 22А) наблюдалось в тянущемся хвосте (фр. №7, №8 и №9).

Анализ фракций SDS – электрофорезом (Рис. 22Б) выявил наличие существенного количества неактивного белка, поскольку 2 фракции №7 и №9 имеют разницу в активности 2 раза, а по белку как минимум в 4–5.



А



Б

Рисунок 22 – Обессоливание белка Avi-ML7 на колонке HiTrap desalting: А–профиль элюции, Б – анализ фракций SDS – электрофорезом в ПААГ: 1 – 17% фракции №7, 2 – 20% фракции №9, 3 – 13% фракции №11, 4 – маркеры молекулярного веса

При выборе ионообменной хроматографии (катионная или анионная) ориентировались на то, что при анионной хроматографии (aniIEC) все кислые белки *E. coli*, в том числе и *birA*, который как было сказано выше, вместе с нашим целевым белком в огромном количестве выпал в нерастворимой фракции телец включения (осадке), должны сорбироваться на анионообменной HiTrap Q HP колонке при данном pH, что собственно нам и нужно для получения высокочистых препаратов.

Анионообменная хроматография (aniIEC) проводилась на колонке 5 ml HiTrap Q HP. Для приготовления белкового образца объединили фракции №2-6 (после обессоливания), общий объём которых составил ~2.65 мл. Как видно на профиле элюции (Рис. 23) белок сильно размазался, активность наблюдалась почти во всех пиках.

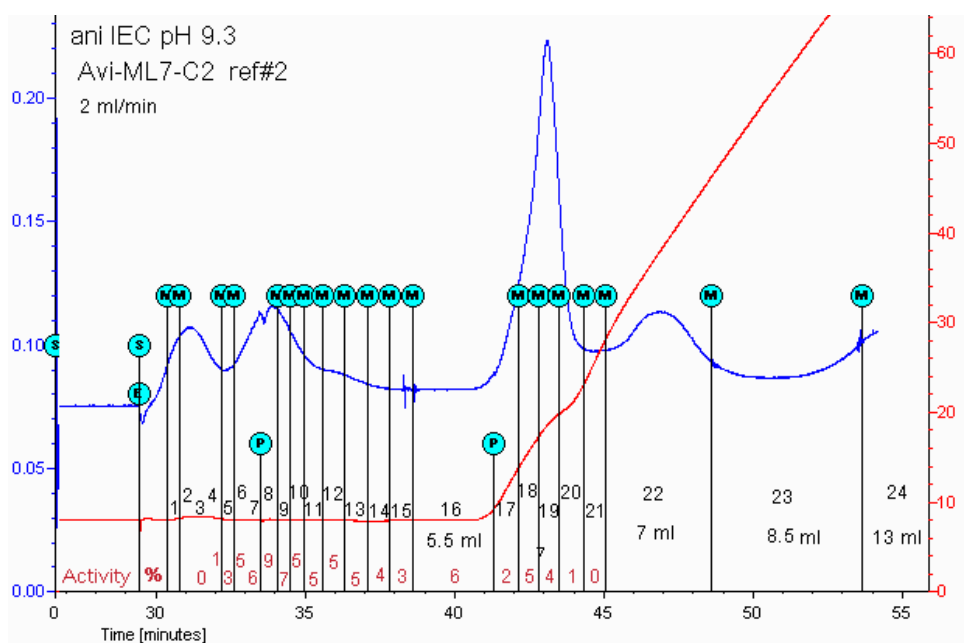


Рисунок 23 – Ионообменная хроматография белка Avi-ML7:

шкала значений слева – единицы поглощения (a.u), шкала значений справа – молярная концентрация NaCl

Начальной фазой градиента снялось ~12% активности, однако на дальнейшую очистку ее брать не стали до проверки э/ф. Всего смылось 76%

активности, из них для дальнейшей очистки – гель фильтрации, взяли только 62% во фракциях №5-16 из несевшего белка (Flow). Фракции №3 (первый белковый пик Flow), №18 (наибольший белковый пик с 12% активности, смытый началом градиента) и №22 (следующий пик), были сконцентрированы для анализа э/ф, чтобы идентифицировать содержимое.

В результате анализа данных фракций SDS – электрофорезом (Рис. 24) осталось непонятным, что находится в первом большом пике, смываемом с колонки началом градиента NaCl. Очень похоже, что это неактивный несфолдингованный белок (или не до конца) + часть нормального активного белка, ведь активность там составила 9-12% (дорожка 5), но, похоже, там находится основное количество целевого белка, судя по электрофорезу (Рис. 24, дорожка 5) и профилю хроматограммы. Данный подход позволил полностью избавиться от *birA*, который обнаружился в последнем пике (дорожка 6) вместе с другими белками *E.coli* и несфолдингованного неактивного белка. К сожалению, очевидно, что рефолдинг идет не на 100% и требуется его дальнейшая оптимизация.

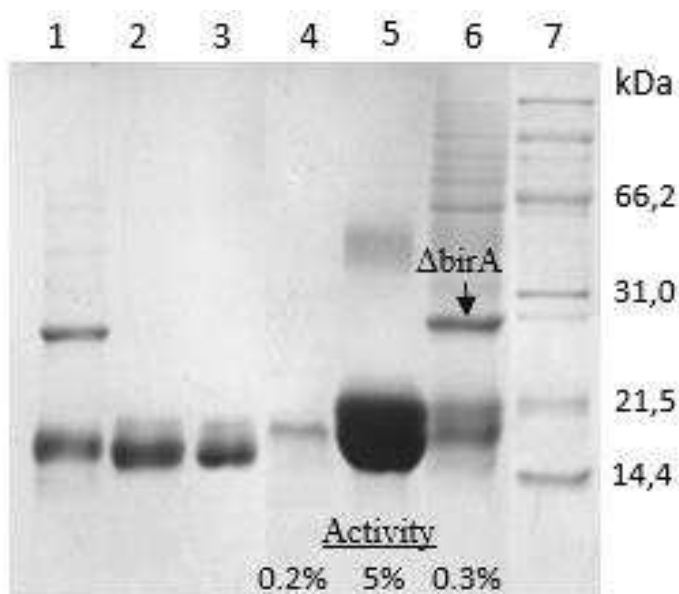


Рисунок 24 – Анализ белковых образцов SDS – электрофорезом в ПААГ: 1 – промытые тельца включения, 2,3 – концентрированный до 435 мкл anIEC для SEC (лизирующий и нативный буфер соответственно), 4,5,6– концентрированные anIEC фракции №3, №18 (~24% нанесено) и №22 соответственно, 7 – маркеры молекулярного веса

Финальным этапом очистки нашего белка была гель фильтрация (SEC) на колонке Sephadex 75. Фракции №5-16 после aniEC сконцентрировали до 435 мкл с переводом в SEC-буфер с pH 7.5. Как видно на Рис. 20 (дорожки 2,3) белковый образец для гель-фильтрации (SEC) получился достаточно чистый, отсутствуют примесные белки. По профилю элюции (Рис. 25) можно предположить, что полученный препарат полностью мономерный, т.к. пик белка очень ровный и симметричный.

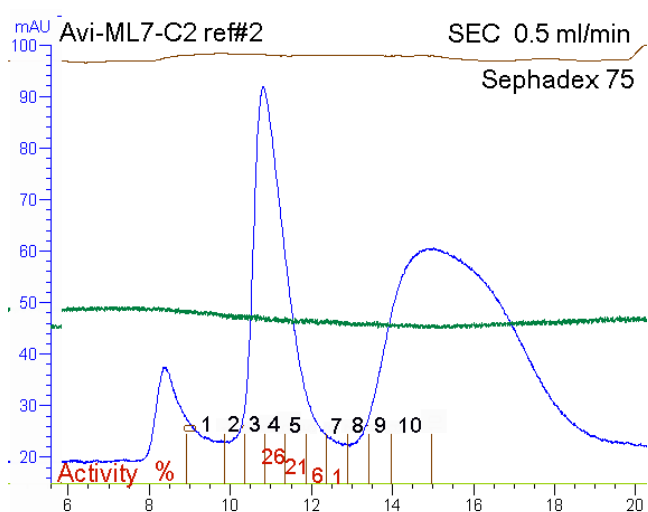


Рисунок 25 – Финальная очистка белка Avi-ML7 – профиль гель-фильтрации (SEC)

Гель-фильтрацию белка Avi-ML7mut решили сделать вообще без детергента (NP-40), и в результате получили высокий выход очень чистого белка - равномерный пик высотой около 255 mAU, примесей не наблюдается (Рис. 26). Детергент NP-40 убрали, чтобы снять спектр поглощения, определить концентрацию белка и сконцентрировать финальный препарат без формирования мицелл детергента, поскольку данный детергент способен концентрироваться вместе с целевым белком. Однако SEC без детергента привел к сильным потерям активности - почти в 3 раза, осталось 36% всего или 11% от исходной. Возможно, стоит вернуть NP-40 обратно в меньшей концентрации для предотвращения образования мицелл или подобрать другой детергент.

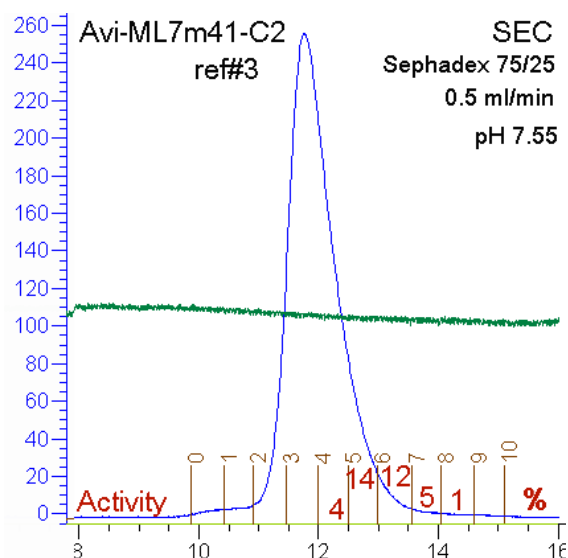


Рисунок 26 – Финальная очистка белка Avi-ML7mut – профиль гель-фильтрации (SEC) без детергента

3.6 Характеризация полученных высокочистых препаратов люциферазы с биотинакцепторным пептидом.

Финальные белковые препараты были получены путем концентрирования фракций №4-6 и №4-7 после гель-фильтрации каждого белкового образца соответственно: ~110 мкл образец Avi-ML7 и ~238 мкл образец Avi-ML7mut. Для длительного хранения при отрицательных температурах, к финальным препаратам был добавлен 100% глицерин в соотношении 1:1.

Тотальная активность финального препарата Avi-ML7mut составила 3 201 600 000 у.е. активности, у препарата Avi-ML7 – 403 480 000 – очень большие потери при очистке, осталось лишь 12% активности от нанесенной на обессоливание.

Степень чистоты полученных препаратов люциферазы с биотинакцепторным пептидом оценивали SDS – электрофорезом в ПААГ. Как видно на электрофореграмме, финальные образцы полностью очищены от посторонних примесей (Рис. 27А, Б дорожки 2,3 и 1,2 соответственно).

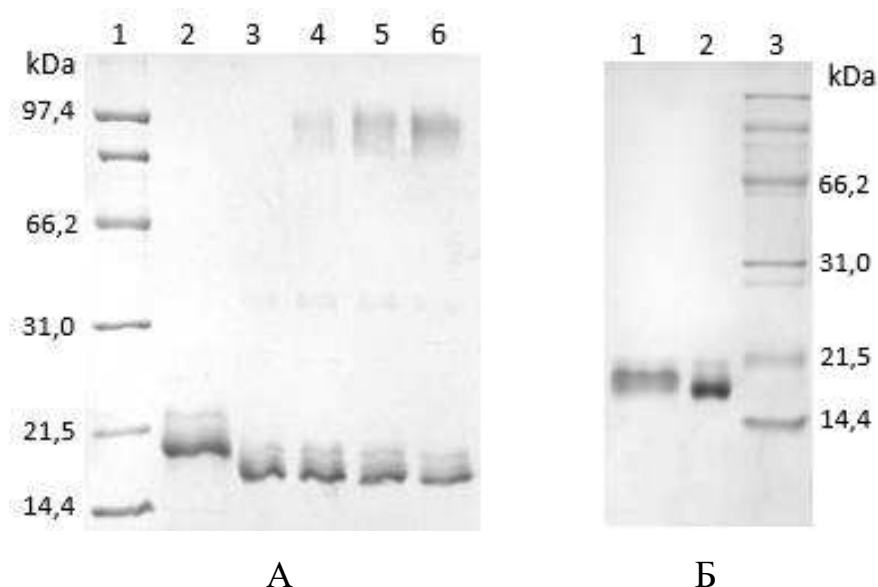


Рисунок 27 – Характеризация финальных препаратов: А – белок Avi-ML7mut: 1 – – маркеры молекулярного веса, 2,3 – конц. Avi-ML7mut фин. (лизирующий и нативный буфер соответственно), 4,5,6 – 1 мкл. фин. конц. +2,3,4 мкл. стрептавидина соответственно (нативный буфер), Б – белок Avi-ML7: 1, 2 – конц. Avi-ML7 фин. до 110+110мкл. глицерола (лиз. и нат. буфер соответственно), 3 – маркеры молекулярного веса

Попытка оценить степень биотинилирования полученных препаратов люциферазы с биотин-акцепторным пептидом путем полунативного электрофореза, оказалась неудачной. Как видно на Рис. 27.А. (дорожки 4,5,6) связывания белка Avi-ML7mut со стрептавидином не обнаружено. Причина неудачи оценки степени биотинилирования возможно в том, что образцы смешивались со стрептавидином непосредственно перед нанесением на гель. То есть, белки просто могли не успеть связаться. Повтор эксперимента с длительной инкубацией образцов, а также полную характеристику полученных препаратов, не провели по причине начала карантинных мероприятий.

ВЫВОДЫ

1. Получены две генно-инженерные конструкции Avi-ML7/ Δ BirA и AviT-ML7mut/ Δ BirA через слабое стоп/старт перекрывание TGATG, для высокоэффективного биотинилирования *in vivo* люциферазы *Metridia longa* на основе экспрессионной системы pET22b+. Корректность конструкций подтверждена секвенированием.

2. Анализ экспрессии гибридных белков с данных конструкций в клетках *E.coli* показал, что целевые белки выпадают в виде нерастворимых телец включения, что существенно облегчает первые этапы очистки, но требует последующего фолдинга для получения функциональных белков.

3. Подобраны условия экстракции целевых белков с минимальными примесями из очищенных телец включения (IV): показано, что растворение IV в незабуференном 4М гуанидине-HCl позволяет повысить чистоту белкового образца для следующих этапов очистки, так как преимущественно кислые белки *E. coli* в этих условиях остаются в осадке.

4. Рядом модификаций оптимизированы условия рефолдинга целевых белков, путем смещения окислительно-восстановительного баланса в сторону окисления: концентрация дитиотреитола (DTT) для полного восстановления цистеинов денатурированного целевого белка составила 50 mM, в процессе последующего рефолдинга оптимальное соотношение окисленного глутатиона (GSSH) к его восстановленной форме (GSH) выбрано как 5:1 mM. Что привело к повышению выхода активного целевого белка ~ в 2,8 раза.

5. Получены белковые мономерные препараты Avi-ML7 и Avi-ML7mut высокой степени очистки для дальнейшей характеристики. Чистота и мономерность подтверждены гель-фильтрацией, денатурирующим SDS- и полунативным электрофорезом.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Маркова, С. В. Билюминесцентный мониторинг обеспечивает возможность регистрации внутриклеточных событий в реальном времени без разрушения клеток и тканей / С. В. Маркова, Н. П. Маликова, Е. С. Высоцкий, Л. А. Франк, И. И. Гительзон // Биофизика. – 2017. – Т. 62. – № 3. – С. 618 – 624.
2. Маркова, С. В. Целентеразин – зависимые люциферазы (обзор) / С. В. Маркова, Е. С. Высоцкий // Биохимия. – 2015. – Т. 80. – № 6. – С. 845 – 866.
3. Athavankar, S. Control of Gene Expression with Small Molecules: Biotin-Mediated Acylation of Targeted Lysine Residues in Recombinant Yeast / S. Athavankar, B. R. Peterson // Chemistry & Biology. – 2003. – V. 10 – № 12 – P. 1245–1253.
4. Badr, C. E. Bioluminescence imaging: Progress and applications / C. E. Badr, B. A. Tannous // Trends in biotechnology. – 2011. – V. 29. – № 12. – P. 624–633.
5. Beckett, D. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation / D. Beckett, E. Kovaleva, P. J. Schatz // Protein Science. – 1999. – V. 8. – № 4. – P. 921 – 929.
6. Borisova, V. V. Recombinant Metridia luciferase isoforms: Expression, refolding and applicability for in vitro assay / V. V. Borisova. L. A. Frank, S. V. Markova, L. P. Burakova, E. S. Vysotski // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2008. – P. 1025 – 1031.
7. Bovenberg, M. S. Multiplex blood reporters for simultaneous monitoring of cellular processes / M. S. Bovenberg, M. H. Degeling, S. Hejazi, R. J. Amante // Analytical Chemistry. – 2013. – V. 85. – № 21. – P. 10205–10210.
8. Chapman-Smith, A. In vivo enzymatic protein biotinylation / A. Chapman-Smith, J. E. Cronan // Biomolecular Engineering. – 1999. – V. 16. – № 1-4. – P. 119 – 125.
9. Chapman-Smith, A. Molecular biology of biotin attachment to proteins / A. Chapman-Smith, J. E. Cronan // The Journal of Nutrition. – 1999. – V. 129. – № 2. – P. 477 – 484.

10. Chapman-Smith, A. The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity / A. Chapman-Smith, J. E. Cronan // Trends in Biochemical Sciences. – 1999. – V. 24. – № 9. – P. 359 – 363.
11. Cronan J. E. Biotination of proteins in vivo: A post-translational modification to label, purify, and study proteins / J. E. Cronan // Journal of Biological Chemistry. . – 1990. – V. 265. – № 18. – P. 10327 – 10333.
12. Diamandis, E. P., (1991). The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. / E. P. Diamandis, T. K. Christopoulos // Clinical Chemistry. – 1991. – V. 37. – № 5. – P. 625–636.
13. Dundas, C. M. (2013). Streptavidin–biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications / C. M. Dundas, D. W. Demonte, S. Park // Applied Microbiology and Biotechnology – 2013. – V. 97. – № 21 – P. 9343–9353.
14. Foreword and introduction to the book (strept)avidin–biotin system // Biomolecular Engineering. – 1999. – V. 16 – P. 1 – 4.
15. Frank, L. A. Application of enzyme bioluminescence for medical diagnostics / L. A. Frank, V. V. Krasitskaya // Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology – 2014. – V. 144. – P. 175–197.
16. Gygi S. P. (1999) Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags / S. P. Gygi, B. Rist, S. A Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, R. Aebersold // Nat. Biotechnol. – 1999. – V. 17. – № 10 – P. 994–999.
17. Hatano, K. A functional screen identifies miRNAs that inhibit DNA repair and sensitize prostate cancer cells to ionizing radiation / K. Hatano, B. Kumar, Y. Zhang, J. B. Coulter, M. Hedayati, B. Mears, X. Ni, T. A. Kudrolli, W. H. Chowdhury // Nucleic Acids Research. – 2015. – V. 43. – № 8. – P. 4075–4086.
18. Haugwitz, M. Multiplexing bioluminescent and fluorescent reporters to monitor live cells / M. Haugwitz, O. Nourzaie, T. Garachtchenko, L. Hu, S. Gandlur // Current Chemical Genomics – 2008. – V. 1 – P. 11–19.
19. Hermanson, G. T. Chapter 11: (Strept)avidin– Biotin Systems / G. T. Hermanson // Bioconjugate Techniques (Third edition). – 2013. – P. 465 – 505.

20. Ishida, M. Effective structure of a leader open reading frame for enhancing the expression of GC-Rich Genes / M. Ishida, T. Oshima // *J.Biochem.* – 2002. – Vol.132. – P.63-70.
21. Kay, B. K. High-Throughput Biotinylation of Proteins / B.K. Kay, S. Thai, V. V. Volgina // *Methods Mol Biol.* – 2009. – V. 498. – P. 185 – 196.
22. Kerppola, T. K. Complementary methods for studies of protein interactions in living cells / T. K. Kerppola // *Nature Methods* volume. –2006. – V. 3. – № 12. – P. 969–971.
23. Khidekel, N. Probing the dynamics of O-GlcNAc glycosylation in the brain using quantitative proteomics / N. Khidekel, S. B. Ficarro, P. M. Clark, M. C. Bryan // *Nature Chemical Biology* – 2007. – V. 3. – № 6 – P. 339–348.
24. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature.* 1970. – 227. P. 680–685.
25. Laitinen, O. H. Brave new (strept)avidins in biotechnology / O. H. Laitinen, H. R. Nordlund, V. P. Hytonen, M. S. Kulomaa // *Trends in Biotechnology.* – 2007. – V. 25. – № 6. – P. 269 – 277.
26. Lijestroem, P. Structure and expression of the ompB operon, the regulatory locus for the outer membrane porin regulon in *Salmonella typhimurium* / P. Lijestroem, I. Laamanen, E.T. Palva // *J. Mol. Biol.* – 1988. – № 201., Vol.4. – P.663-673.
27. Lis, S. J. The Gene Encoding the Biotin Carboxylase Subunit of Escherichia coli Acetyl-coA Carboxylase / S. J. Lis and J. E. Cronan // *The Journal of Biological Chemistry.* – 1992. – V. 267. – № 2. – P. 855 – 863.
28. Luong, J. H. T. Biotin interference in immunoassays based on biotin-strept(avidin) chemistry: An emerging threat / J. H. T. Luong, K. B. Malec, J. D. Glennon // *Biotechnology Advances.* – 2019.
29. Lupold, S. E. A real time Metridia luciferase based non-invasive reporter assay of mammalian cell viability and cytotoxicity via the β -actin promoter and enhancer / S. E. Lupold, T. Johnson, W. H. Chowdhury // *Plos One.* – 2012. – V. 7. – № 5. – e36535.

30. Markova, S. V. Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod *Metridia longa*. A novel secreted bioluminescent reporter enzyme / S. V. Markova, S. Golz, L. A. Frank, B. Kalthof, E. S. Vysotski // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. V. 279. – № 5. – P. 3212–3217.
31. Markova, S. V. Shining Light on the Secreted Luciferases of Marine Copepods: Current Knowledge and Applications / S. V. Markova, M. D. Larionova, E. S. Vysotski // *Photochemistry and photobiology (Photochem Photobiol)*. – 2018.
32. Markova, S. V. The smallest natural high-active luciferase: Cloning and characterization of novel 16.5-kDa luciferase from copepod *Metridia longa* / S. V. Markova, M. D. Larionova, L. P. Burakova, E. S. Vysotski // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2015 – V. 457. – № 1 – P. 77–82.
33. Murakami, G. Chemical library screening identifies a small molecule that downregulates *Sod1* transcription for drugs to treat amyotrophic lateral sclerosis / G. Murakami, H. Inouye, K. Tsukito, Y. Asai, Y. Amagai, K. Aiba // *Journal of Biomolecular Screening*. – 2011. – V. 16. – № 4. – P. 405–414.
34. Ong S. E. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative / S. E. Ong, M. Mann // *Nat. Chem. Biol.* – 2005. – V. 1. – № 5 – P. 252–262.
35. Satiaputra, J. Mechanisms of biotin-regulated gene expression in microbes / J. Satiaputra, K.E. Shearwin, G.W. Booker, S.W. Polyak // *Synthetic and Systems Biotechnology*. – 2016. – V. 1. – № 1 – P. 17–24.
36. Shatz, P.J. Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: A 13 residue consensus peptides biotinylation in *Escherichia coli* / P.J. Shatz // *Biotechnology*. – 1993. – V. 10. – № 11. – P. 1138 – 1143.
37. Shin, S. K. Application of a bridging ELISA for detection of anti-erythropoietin binding antibodies and a cell-based bioassay for neutralizing antibodies in human sera / S. K. Shin, S. K. Ha, K. W. Lee, T. H. Yoo, S. R. Yun // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* – 2010. – V. 52. – № 2 – P. 289–293
38. Smirnova, D. V. Firefly luciferase-based fusion proteins and their applications in bioanalysis / D. V. Smirnova, N. N. Ugarova // *Photochemistry and Photobiology*. – 2017. – V. 93. – № 2. – P. 436–447.

39. Sun, S. In vivo analysis of protein-protein interactions with bioluminescence resonance energy transfer (BRET): Progress and prospects / S. Sun, X. Yang, Y. Wang, X. Shen // *International Journal of Molecular Science* – 2016. – V. 17. – № 10. – P. 21.
40. Takenaka, Y, Computational analysis and functional expression of ancestral copepod luciferase / Y. Takenaka, A. Noda-Ogura, T. Imanishi, A. Yamaguchi, T. Gojobori, Y. Shigeri (2013) *Gene* – 2013. – V. 528. – № 2. – P. 201–205.
41. Tannous, B.A. Codon-optimized *Gaussia* luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo / B.A. Tannous, D. E. Kim, J. L. Fernandez, R. Weissleder, X.O Breakefield // *Molecular Therapy*. – 2005. V. 11. – № 3. – P.435–443.
42. Ustinova, J. Development of a Photochemistry and Photobiology 15 luciferase-based system for the detection of ZnT8 autoantibodies / J. Ustinova, E. Zusinaite, M. Utt, K. Metskula, K. Reimand, V. Huchaiyah, A. Merits // *Journal of Immunological Methods*. – 2014. – V. 405. – P. 67–73.
43. Verma, V. Biotin-tagged proteins: Reagents for efficient ELISA-based serodiagnosis and phage display-based affinity selection / V. Verma, C. Kaur, P. Grover, A. Gupta, V. K. Chaudhary // *Plos One*. – 2018. – V. 13. – № 1.
44. Wehr, M. C. Split protein biosensor assays in molecular pharmacological studies / M. C. Wehr, M. J. Rossner // *Drug Discovery Today*. – 2016. – V. 21. – № 3. – P. 415–429.
45. Wilchek, M. Essentials of biorecognition: The (strept)avidin–biotin system as a model for protein–protein and protein–ligand interaction / M. Wilchek, E. A. Bayer, O. Livnah // *Immunology Letters*. – 2006. – V. 103. – № 1. – P. 27 – 32.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт

Базовая кафедра биотехнологии
кафедра

УТВЕРЖДАЮ
/ Заведующий кафедрой


подпись Т. Г. Волова

« 26 » июля 2020 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01.Биология

Получение высокочистых препаратов биотинилированной *in vivo* люциферазы

Metridia для аналитического применения

тема

Руководитель


подпись, дата

с.н.с., к.б.н.

С. В. Маркова

Выпускник


подпись, дата

А. В. Кохановская

Красноярск 2020