

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт
Базовая кафедра биотехнологии
Кафедра

УТВЕРЖДАЮ
Заведующая кафедрой
_____ Т.Г. Волова
Подпись, инициалы фамилия
« ____ » ____ июня ____ 2022г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01. Биология

Код наименования направления

Анализ потенциала люциферазы Metridia как комплементационного
репортера для мониторинга белок-белковых взаимодействий в клетках.

тема

Руководитель

к.б.н., доцент

С. В. Маркова

подпись, дата

должность, ученая степень

инициалы, фамилия

Выпускник

А. Г. Селивёрстова

Подпись, дата

инициалы, фамилия

Красноярск 2022

РЕФЕРАТ

Бакалаврская работа по теме: «Анализ потенциала люциферазы *Metridia* как комплементационного репортера для мониторинга белок-белковых взаимодействий в клетках» состоит из 36 страниц текстового документа, 12 рисунков, 1 таблицы и 30 источников использованной литературы.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, ЛЮЦИФЕРАЗА, БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ, METRIDIA LONGA, БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ РЕПОРТЕР.

Цель данной работы: в рамках исследования возможностей создания комплементационного анализа белок-белковых взаимодействий на основе люциферазы *Metridia* оценить функциональную активность отдельных фрагментов молекулы, потенциально способных к комплементации и проверить уровень восстановления активности при их реассоциации.

Фрагменты люциферазы *Metridia*, соответствующие отдельным негомологичным повторам белковой последовательности, были экспресированы в клетках *E. coli*, показано, что по отдельности данные фрагменты люциферазы не имеют никакой биолюминесцентной активности, так же показано, что смесь фрагментов не приводит к их спонтанной реассоциации и восстановлению функциональной активности люциферазы.

Для обеспечения стерического сближения фрагментов люциферазы была выбрана последовательность дрожжевого лейцинового зиппера размером 31 а/к остаток – фрагмента ДНК-связывающего транскрипционного фактора GCN4/YEL009C. Последовательности лейцинового зиппера были слиты в единой рамке считывания с последовательностью люциферазных фрагментов. Смешивание и совместная инкубация двух фрагментов люциферазы, содержащих лейциновые зипперы, приводило к формированию гетеродимера и восстановлению активности люциферазы, которое в финальной точке достигало приблизительно 5%.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	7
1.1. Люцифераза <i>Metridia longa</i> как биолюминесцентный репортерный белок.....	7
1.2. Комплементация белковых фрагментов репортера для оценки белок-белковых взаимодействий.....	10
1.3. Дрожжевой лейциновый zipper белка GCN4/YEL009C как модельный объект для стерических сближений.....	13
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	15
2.1 Материалы.....	15
2.2 Методы.....	16
2.2.1. Белковый SDS-ПААГ электрофорез.....	16
2.2.2. Приготовление образцов для белкового SDS-ПААГ электрофореза	16
2.2.3. Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i>	16
2.2.4. Наращивание образцов <i>Metridia Lucs</i> в аналитике.....	17
2.2.5. Подготовка образцов для определения активности.....	17
2.2.6. Измерение биолюминесцентной активности.....	17
2.2.7. Приготовление образцов для анализа экспрессии.....	17
2.2.8. Приготовление компетентных клеток BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL.....	18
2.2.9. Электропорация клеток <i>E. coli</i>	18
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	20
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	22
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	23

ВВЕДЕНИЕ.

Исследование белок-белковых взаимодействий в живой клетке является одним из основных направлений современной протеомики. Белок-белковые взаимодействия принимают участие в большинстве важнейших клеточных процессов, таких как: транскрипция, репликация, мембранный транспорт, клеточные сигналы и другое. Понять, как осуществляется поддержание жизни клетки, невозможно без идентификации всех взаимодействующих друг с другом белков, кодируемых геномом.

Одним из способов исследования белок-белковых взаимодействий является метод комплементации белковых фрагментов. Принцип метода основан на свойстве белка-репортера восстанавливать свою активность при сборке из двух независимых фрагментов во время стерического сближения. По активности репортера можно судить о взаимодействии двух целевых белков, каждый из которых слит с отдельным таким фрагментом.

В качестве таких репортеров представляется очень перспективным использование биolumинесцентных белков. Среди популярных биolumинесцентных белков, применяющихся в качестве репортерных молекул, используются фотопротеины кишечнорастворимых, люциферазы из кораллов, светлячков и ракообразных. При выборе оптимального репортера руководствуются спектральными параметрами белков, их размерами и наличием кофакторов, необходимых для осуществления биolumинесцентной реакции. Особенными преимуществами среди биolumинесцентных репортерных молекул обладают люциферазы, выделенные из морских копепод семейства Metridinae – люциферазы, клонированные из организмов *Gaussia princeps* и *Metridia longa*.

Люциферазы копепод – семейство мелких секреторных белков, содержащих сигнальный пептид, отвечающий за яркую секретируемую биolumинесценцию некоторых морских копепод. Небольшой размер, сильная

люминесцентная активность и высокая стабильность, включая термостабильность, делают секретируемые люциферазы копепод очень привлекательными кандидатами в качестве репортерных белков, которые особенно полезны для неразрушающих репортерных анализов и для высокопроизводительного формата.

Данные люциферазы, характеризующиеся высокой степенью гомологии аминокислотных последовательностей, являются перспективными репортерными молекулами для технологий биолюминесцентного имиджинга. Эти белки обладают небольшой молекулярной массой (до 23 кДа) и требуют только наличия кислорода как кофактора для протекания биолюминесцентной реакции. Данные люциферазы показывают высокую биолюминесцентную активность, в 200 раз выше, чем Renilla [1] и обладают термостабильностью. В структуре аминокислотных последовательностей данных люцифераз обнаружены N-концевые сигнальные пептиды, которые отщепляются от белков в процессе секреции в окружающую среду.

Наиболее исследованный представитель семейства люцифераз копепод – клонированная люцифераза MLuc из копеподы *Metridia longa*. Данную люциферазу сразу после клонирования стали успешно применять в качестве биолюминесцентных репортёров *in vivo* и *in vitro*. На данный момент сфера применения MLuc успешно расширяется. Высокая активность и стабильность клонированной в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН люциферазы *Metridia longa* предполагает большой потенциал ее использования в качестве биолюминесцентного репортера для различных аналитических приложений. Для использования MLuc люциферазы как репортера белок-белковых взаимодействий методом комплементации белковых фрагментов необходимо определить возможные комплементирующие фрагменты люциферазы и их репортерный потенциал.

Цель данной работы: в рамках исследования возможностей создания комплементационного анализа белок-белковые взаимодействия на основе люциферазы *Metridia* оценить функциональную активность отдельных фрагментов молекулы, потенциально способных к комплементации и проверить уровень восстановления активности при их реассоциации.

В задачи работы входило:

- 1) Экспрессировать фрагменты люциферазы *Metridia*, потенциально способных к комплементации, по отдельности в бактериальных клетках;
- 2) Оценить уровень экспрессии и растворимости рекомбинантных белков;
- 3) Оценить функциональную активность отдельных фрагментов, а также их способности к самосборке и к восстановлению полной функциональной активности люциферазы.

Работа проводилась на базе лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН, г. Красноярск.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.

1.1. Люцифераза *Metridia longa* как биолюминесцентный репортерный белок.

Большинство видов копепод, обладающих секретлируемой биолюминесценцией, относят к надсемейству Augartiloidea. Только 4 семейства среди них включают представителей, являющихся биолюминесцентными: Metridinidae, Heterorhabdidae, Lucicutiidae, и Augartilidae [2].

Целентеразин-зависимые люциферазы из копепод *Gaussia* и *Metridia* катализируют окисление целентеразина в простой реакции, генерируя при этом CO_2 , целентерамид и голубой свет с пиком около 480 нм. [3] Для запуска биолюминесцентной реакции необходимо только присутствие кислорода. [4] Это является важной характеристикой биолюминесцентных белков как потенциальных репортеров.

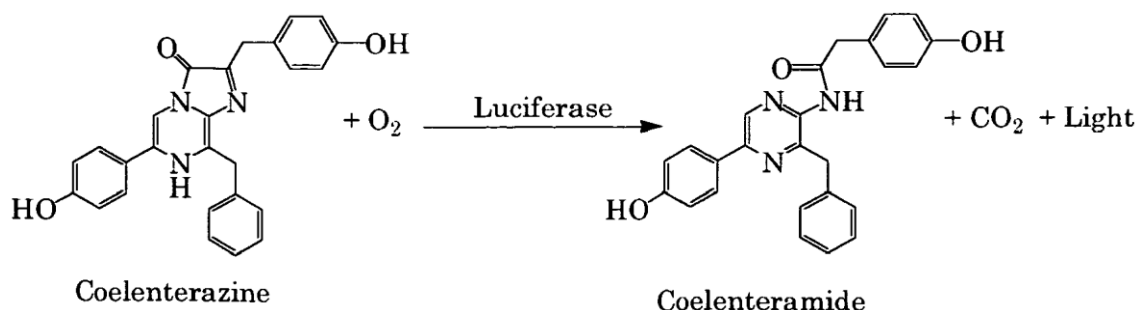


Рисунок 1. Схематическое изображение механизма биолюминесцентной реакции, катализируемой люциферазами RLuc, GLuc и MLuc

Копеподные люциферазы *Gaussia* и *Metridia* (~20 kDa) [5], являющиеся природными секретлируемыми белками, совсем недавно стали использоваться как биолюминесцентные репортеры в биоимиджинге. Данные люциферазы являются самыми малыми по размеру из всех известных на сегодняшний день люцифераз. Эта характеристика является существенной при выборе оптимального репортера для конкретных исследовательских задач [6].

В оптимальных условиях кинетика свечения происходит по типу «вспышка» с быстрым затуханием в течении нескольких минут, однако, в ряде исследований показано, что биолюминесцентный сигнал может протекать несколько десятков минут, что важно для использования люциферазы в качестве репортерного белка. Такой биолюминесцентный сигнал может быть достигнут за счет изменения условий проявления активности люцифераз, например, при добавлении детергента Triton X-100 в буфер для измерения наблюдается существенное замедление кинетики биолюминесцентной реакции [7].

Таким образом, секретлируемые копеподные люциферазы на сегодняшний день являются наиболее перспективными репортерными молекулами. Именно на их основе создаются репортеры для задач молекулярного имиджинга, а также для проведения лабораторных анализов.

На данный момент наиболее изученными целентеразин-зависимыми люциферазами из копепод являются люциферазы *Gaussia* и *Metridia*.

В 2002 году ген люциферазы был выделен и клонирован из *Gaussia princeps*, представителя семейства копепод *Metridinae* [8]. Преимуществами люциферазы GpLuc являются относительно небольшой молекулярный вес (до 20 кДа), высокая стабильность, высокая удельная активность, а также то, что белок секретируется в окружающую среду в живой природе. Благодаря этому люцифераза может эффективно экспрессироваться даже в клетках насекомых и млекопитающих.

На сегодняшний день известны гены из копепод: *Metridia longa* [9], *Metridia pacifica* [10], *Gaussia princeps* [8], *Metridia oktotosis*, *Pleuromamma abdominalis*, *Lucicutia ovariformes*, *Heterostylites major* и других [11].

В аминокислотной структуре GpLuc люциферазы выделяют два повторяющихся фрагмента, содержащих консервативные цистеиновые остатки с высокой степенью идентичности. Японскими учеными было

проведено исследование функциональной роли этих аминокислотных повторов в люциферазе GrLuc. Для этого были созданы генетические конструкции, позволяющие экспрессировать по отдельности аминокислотные повторы длиной по 71 остатку. Оказалось, что каждый из выделенных белков обладал биолюминесцентной активностью, что позволило сделать предположение о наличии двух независимых каталитических доменов люциферазы из *Gaussia princeps* [13].

В 2004 году был идентифицирован и клонирован ген люциферазы из *Metridia longa* [9]. Показано, что люцифераза MLuc, аналогично люциферазе из *Gaussia princeps* обладает способностью секретироваться из железистых клеток копепод.

Секреция в окружающую среду обусловлена особенностями аминокислотного состава люциферазы MLuc. Структура аминокислотной последовательности люциферазы MLuc в общем виде представлена вариабельным N-концом и очень консервативным C-концом. Выделяют N-концевую последовательность длиной 17 аминокислот, подобная последовательность содержится у всех известных изолированных люциферазных изоформ. Этот пептид, называемый сигнальным, обеспечивает секрецию белка из железистых клеток в просвет биолюминесцентных желез и далее в морскую воду, причем при секреции отщепляется специальным ферментом сигнальной пептидазой. Вариабельный N-конец, занимающий иногда до трети молекулы, не является необходимым для активности люциферазы, его удаление иногда даже приводит к повышению активности белка [8]. Консервативный C-конец представлен двумя неидентичными тандемными повторами, содержащими высококонсервативный мотив размером в 31 аминокислотный остаток, каждый из которых содержит 5 цистеиновых остатков. Соответственно, люцифераза *Metridia* содержит 5 дисульфидных связей, стабилизирующих структуру молекулы.

В настоящий момент, секретируемые изоформы люциферазы копепод *Metridia longa* применяются в качестве биолюминесцентных репортеров в различных исследованиях и успешно используются для анализа *in vitro* [14] и *in vivo* в клетках млекопитающих [4]. Например, иммунологические анализы, анализ комплементации белковых фрагментов, неинвазивная биолюминесцентная визуализация *in vivo* (Рис. 2) [5].

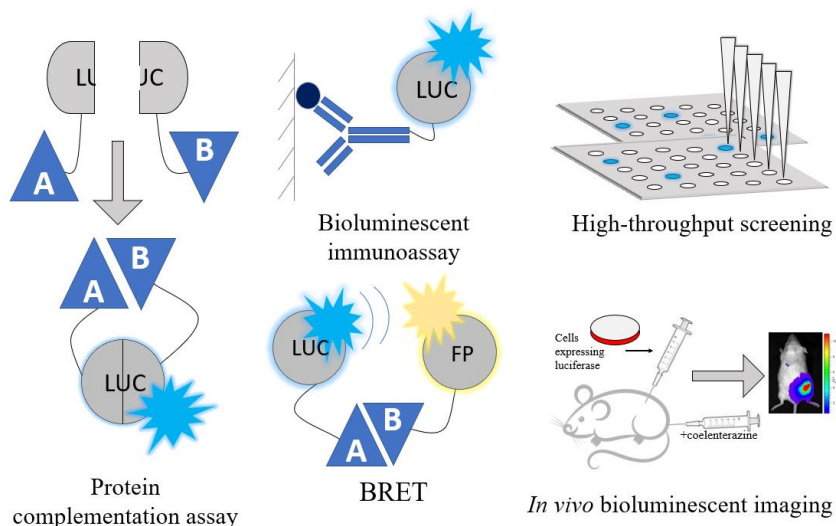


Рисунок 2 – Схематическое представление основных областей аналитического применения люциферазы копепод [5].

1.2. Комплементация белковых фрагментов репортера для оценки белок-белковых взаимодействий.

Одним из методов обнаружения белок-белковых взаимодействий является комплементация белковых фрагментов. Комплементация белковых фрагментов – способ исследования белок-белковых взаимодействий, где белок-репортер разделен на два нефункциональных фрагмента, которые в виде фьюжинов слиты с двумя целевыми белками. При взаимодействии целевых белков друг с другом фрагменты репортерного белка также сближаются и формируют активный фермент, регистрация активности которого позволяет оценить взаимодействие целевых белков [15].

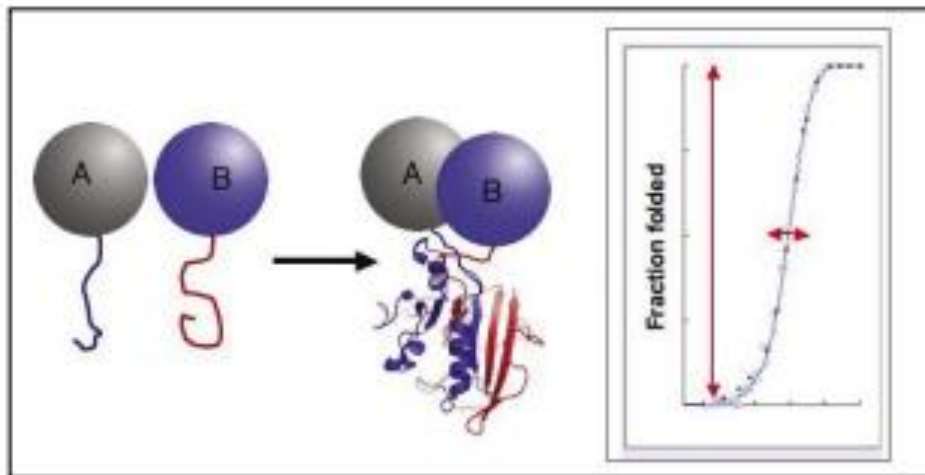


Рисунок 3. Динамику белкового комплекса можно отследить путем слияния двух белков с комплементарными фрагментами репортерного белка. (белки «А» и «В» представлены двумя сферами) [15].

Схема такого анализа представлена на Рис. 3. Целевые белки «А» и «В» по отдельности сливаются в единый полипептид с комплементарными фрагментами репортерного белка. Если белки «А» и «В» взаимодействуют, то фрагменты репортера собираются вместе, складываются в нативную структуру с восстановлением функциональной активности [15].

На данный момент все используемые биолюминесцентные репортеры условно делят на два типа: фотопротеины и люциферазы [16]

В качестве репортеров для детекции белок-белковых взаимодействий методом комплементации белковых фрагментов, в том числе для мониторинга белок-белковых взаимодействий в клетках млекопитающих предложено использовать несколько белков [17], включая бета-лактамазу [18], люциферазу из коралла *Renilla* [19], люциферазу из копепод *Gaussia* [20] и светлячковую люциферазу [21].

Более широкое применение получили флуоресцентные [22] и биолюминесцентные белки [23], где сигнал детекции белок-белкового взаимодействия является оптическим.

Создано несколько различных вариантов сплит-систем на основе фрагментов зеленого флуоресцентного белка, синего, голубого, желтого и других флуоресцентных белков. Цвет различных комбинаций фрагментов флуоресцентных белков в основном зависит от N-концевого фрагмента и в меньшей степени от C-концевого фрагмента. Эта особенность позволяет отображать несколько белок-белковых взаимодействий внутри клетки, определять их порядок, а также выявлять дифференциальные различия [24]. Использование флуоресцентных белков-репортеров также открывает возможность определения внутриклеточной локализации объекта исследования путем микроскопирования. Основными недостатками флуоресцентных репортеров являются довольно высокий фон, обусловленный клеточной аутофлуоресценцией, токсичность интенсивного возбуждающего флуоресценцию света для живых объектов и маленький динамический диапазон измерений.

Важным моментом в исследовании комплементации белковых фрагментов, от которого зависит успех всего эксперимента, является поиск оптимального места разделения белковой молекулы на два отдельных фрагмента, позволяющих максимально восстанавливать активность репортера при стерическом сближении. Первоначально точка разрыва определялась эмпирически, например, при изучении люциферазы из копепод *Gaussia* было испробовано 41 место разрыва (Рис. 3) пока был найден оптимальный для данного белка вариант [20].

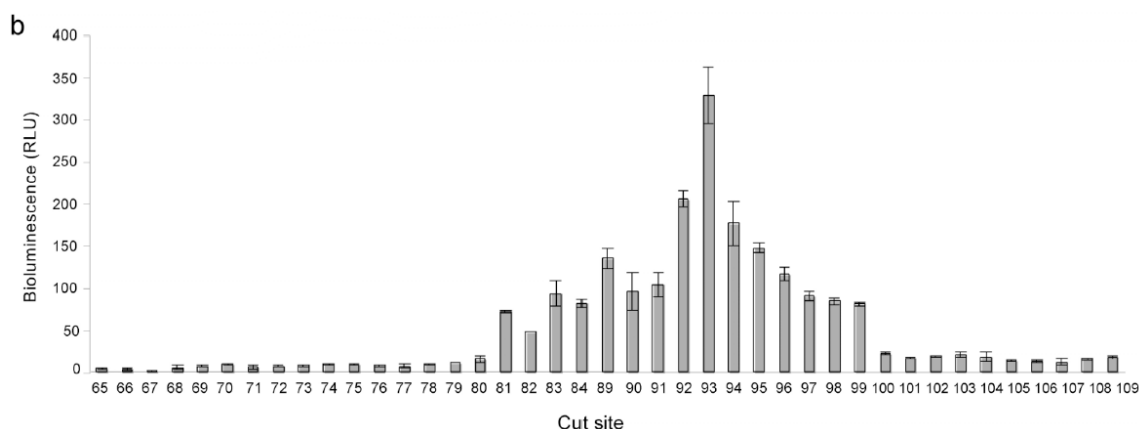


Рисунок. 4 – Восстановление активности люциферазы *Gaussia* при изменении точки разрыва молекулы при формировании комплементирующих фрагментов [20].

1.3. Дрожжевой лейциновый zipper белка GCN4/YEL009C как модельный объект для стерических сближений.

В качестве модельной системы исследования белок-белковых взаимодействий в данной работе был выбран дрожжевой лейциновый zipper белка GCN4/YEL009C [25,26].

Одним из структурных мотивов белков, обеспечивающих белок-белковых взаимодействия, является мотив из двух закрученных в суперспираль α -спирали. К этому классу относится и небольшой простой структурный мотив «лейциновый zipper», обеспечивающий **димеризацию и** белок-белковое связывание в ряде онкогенов, факторах транскрипции, ДНК-связывающих белках и других белках, регулирующих генную экспрессию [27; 28].

С помощью лейцинового zipperа белки формируют гомо- или гетеродимеры белков. В основном взаимодействие происходит за счет гидрофобного слипания лейциновых остатков, находящихся в каждом седьмом положении каждой из α -спиралей. Благодаря этому свойству, лейциновые zipperы иногда используют в белковой инженерии как димеризационный фрагмент [29].

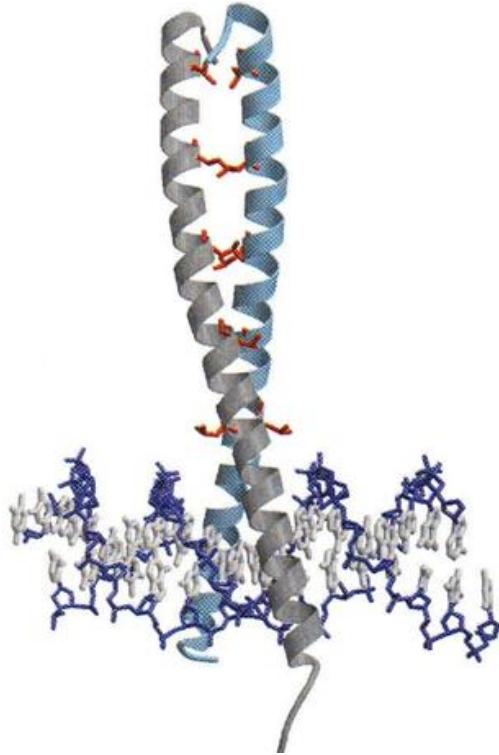


Рисунок 5. Схема образования димера ДНК-связывающего белка из параллельных α -спиралей лейцинового zipper

Структурный мотив «лейциновый zipper» успешно применяют как модель для разработки и оценки методов исследования белок-белковых взаимодействий. Например, лейциновый zipper дрожжевого фактора транскрипции GCN4 был использован при исследовании комплементационных свойств фрагментов люциферазы из *Gaussia* [20].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы.

Агароза, легкоплавкая агароза ("Bio-Rad"); 80% изопропанол, 96 % этанол;

Наборы для очистки ДНК: QIAquick PCR Purification Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit и QIAquick Gel Extraction Kit фирмы QIAGEN;

Ампициллин, IPTG (изопропил- β -D-тиогалактопиранозид) (Sigma), Трис, ЭДТА-натриевая соль (Sigma), целентеразин (MolProbs).

Культуральные среды:

LB-среда – на 1 л: 10 г бакто-триптона (Difco); 5 г дрожжевого экстракта (Sigma); 7,5 г NaCl; pH 7,0;

LB-агар – на 1 л LB -среды 15 г агара (Difco);

SOC-среда – на 1 л: 20 г бакто-триптона (Difco), 5 г дрожжевого экстракта (Sigma), 0,5 г NaCl, 20 мМ глюкоза; pH 7,5.

Для электрофореза белковых образцов использовали: лизирующий буфер (50 мМ Трис-HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% глицерин; 50 мМ дитиотреитол (ДТТ) 5% β -меркаптоэтанол; 0,25% бромфеноловый синий), акриламид и бисакриламид, ПСА (персульфат аммония, Bio-Rad), SDS (додецилсульфат натрия), ТЕМЕД.

Растворы:

ML-буфер: 50 мМ Tris-HCl pH 7.5, 500 мМ NaCl, 0.01% gelatin

OB буфер: 20 мМ Tris-HCl pH 7.0, 1 мМ EDTA

Sample буфер: 45 мМ Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% Glycerol, 50 мМ DTT, 1-5% β -mercaptoethanol, ~0.25 % Bromphenol blue

TFB-буфера: K-MES, pH 6.2, 100 мМ KCl, 45 мМ MnCl₂, 10 мМ CaCl₂, 3 мМ NaCoCl₃

Генотипы использовавшихся штаммов *E. coli*:

BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL: *E. coli* B F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal* λ(DE3) *endA* Hte [*argU proL Camr*] [*argU ileY leuW Strep/Spec^r*]

2.2 Методы.

В работе использовались следующие методы:

2.2.1. Белковый SDS-ПААГ электрофорез

Состав белковых препаратов определяли путем электрофореза в 12.5% полиакриламидном геле по методу Лэмли [30].

2.2.2. Приготовление образцов для белкового SDS-ПААГ электрофореза

Для приготовления образцов растворимой и нерастворимой частей клеток к осажденным клеткам из 500 мкл культуры добавили 100 мкл буфера OB. Клетки разрушали ультразвуком трижды в течение 6 секунд. После центрифугирования супернатант отбирали и смешивали в пропорции 1:1 с двукратным лизирующим буфером, оставшийся осадок растворяли в 100 мкл лизирующего буфера. Для приготовления образцов целых клеток к осажденным клеткам из 500 мкл культуры добавляли 200 мкл лизирующего буфера. Все образцы кипятили 3 мин перед нанесением, наносили по 7 мкл в каждую лунку.

2.2.3. Трансформация компетентных клеток *E. coli*.

К 25 мкл компетентных клеток *E. coli* добавляли 0.5 мкл. плазмиды. Инкубировали на льду в течении 30 минут, далее проводили тепловой шок для клеток при температуре 42°C в течении 45 секунд для XL1-Blue штамма и 25 секунд для RIPL. Охлаждали и добавляли 100 мкл среды SOC, после чего инкубировали в термостате в течении 1 часа при температуре 37°C. Инкубированную суспензию переносили на чашки Петри с LB агаром и

ампициллином. Суспензию растирали шпателем, чашки оставляли на ночь в термостате при температуре 37°C.

2.2.4 Нарращивание образцов *Metridia Lucs* в аналитике.

Клетки *E. coli*, содержащие плазмиды, выращивали в 6 мл LB-среды, содержащей ампициллин (200 мкг/мл) и растили с постоянным перемешиванием (220 об/мин) при 37°C до достижения клетками оптической плотности $OD_{500}=1.2$. Индукцию синтеза белка осуществляли добавлением 1mM IPTG в течении одного часа в шейкере-инкубаторе.

2.2.5. Подготовка образцов для определения активности.

2 мл индуцированной культуры центрифугировали и получали осадок, который ресуспендировали в 200 мкл ML буфера. Озвучивание клеток ультразвуком производилось на ультразвуковом дезинтеграторе Qsonic при 22 кГц 3 раза по 6 секунд с промежуточным охлаждением во льду на 15 секунд.

2.2.6. Измерение биолюминесцентной активности.

Измерение биолюминесцентной активности белков проводили с использованием люминометра БЛМ-003 (ООО Оберон-К, Россия). В кювету для измерения вносили 490 мкл ML-буфера и 10 мкл образца белка. Для запуска биолюминесцентной реакции в кювету впрыскивалось 5 мкл целентеразина 1×10^{-4} М. За биолюминесцентную активность образцов принимали среднее значение как минимум трех параллельных измерений.

2.2.7. Приготовление образцов для анализа экспрессии.

Подготавливали 3 образца: целые клетки – из 500 мкл индуцированной клеточной культуры получали осадок с помощью центрифугирования в

течении трех минут на 5000 оборотов/мин. и ресуспендировали в Sample buffer. Объем рассчитывался исходя из оптической плотности образцов.

Растворимая и нерастворимая части целых клеток – по 500 мкл индуцированной культуры центрифугировали в течении трех минут на 5000 оборотов/мин, к полученному осадку добавляли ОБ буфер, объем рассчитывался исходя из оптической плотности. Далее образцы озвучивали ультразвуком на Qsonic при 22 кГц 3 раза по 6 секунд с промежуточным охлаждением во льду на 15 секунд. После, повторно центрифугировали 5 минут на 14000 оборотов/мин. Для нерастворимой части целых отделяли осадок от супернатанта и добавляли к осадку Sample buffer, в объеме относительном оптической плотности. Для растворимой части целых клеток использовали полученный ранее супернатант в объёме 100 мкл и добавляли к нему 100 мкл Sample buffer.

2.2.8. Приготовление компетентных клеток BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL

В 20 мл LB-среды бактериологической петлей вносили с чашки Петри 2-3 колонии штамма XLI-Blue или RIPL, и при интенсивном перемешивании клетки растили при 37°C до оптической плотности $OD_{590}=0,6$. Далее клетки охлаждали во льду 15 мин, разливали по 2 мл в пробирки и центрифугировали (2 мин, 3500 об/мин, 4°C). Среду осторожно сливали, добавляли 750 мкл холодного TFB-буфера, клетки держали во льду 15 мин, периодически встряхивая. Затем центрифугировали (2 мин, 3500 об/мин, при 4°C), супернатант сливали и к осадку клеток вносили 200 мкл TFB, осторожно растворяли. Для хранения к раствору суперкомпетентных клеток добавляли 80% глицерин и помещали в холодильник при -80°C.

2.2.9. Электропорация клеток *E. coli*.

Инактивировали лигазную смесь путём инкубации при 70 °С в течении 10 минут. К 80 мкл электрокомпетентных клеток *E. coli* добавляли 2 мкл лигазной смеси, перемешивали и переносили в охлажденную ячейку электропоратора («Bio-Rad»). Параметры электропорации: 1.8 кВ, 25 мкФ, 200 Ом, зазор ячейки 0.1 см, время импульса ~4 мсек. После проведения импульса к клеткам добавляли 2 мл SOC-среды и инкубировали в шейкере-инкубаторе при 37°С в течение 1 часа при постоянном перемешивании, затем высевали на LB-агар.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.

Изъяты страницы 20-30 в связи с авторским правом

ВЫВОДЫ.

1. Получена экспрессия в клетках *E.coli* отдельных фрагментов люциферазы *Metridia*, соответствующих неидентичным тандемным повторам в ее последовательности. Уровень экспрессии для всех вариантов был приблизительно одинаковым и составлял примерно 10% от всех клеточных белков.
2. Проведен функциональный анализ активности фрагментов люциферазы *Metridia*. Показано, что они не имеют биолюминесцентной активности по отдельности.
3. Показано, что исследованные фрагменты не взаимодействуют друг с другом при их простом смешивании и инкубации.
4. Фрагменты люциферазы *Metridia*, имеющие в своей структуре Zip-фрагмент, наоборот, способны образовывать функционально активную люциферазу при принудительном стерическом сближении.. Процент восстановления активности составляет до 5% в финальной точке.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

MLuc – люцифераза копепод *Metridia longa*

GLuc – люцифераза копепод *Gaussia princeps*

RLuc – люцифераза из коралла *Renilla reniformis*

а/к – аминокислота

ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид

кДа – килодальтон, 1000 а.е.м.

М – концентрация, моль/ литр

мкл – микролитр, 10^{-6} л

мкМ – микромоль/литр, 10^{-6} М

мл – миллилитр, 10^{-3} л

ммМ – миллимоль/литр, 10^{-3} М

ПЦР – полимеразная цепная реакция

SDS – додецилсульфат натрия

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Tannous B.A. Codon-optimized *Gaussia luciferase* cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo / D. E. Kim, J.L. Fernandez, R. Weissleder, X. O. Breakefield // *American Society of Gene Therapy* vol. 11,3 – 2005 P. 435-43.
2. Herring, P.J. Copepod luminescence / P.J. Herring // *Hydrobiologia*. – 1988. – №167. – P. 183–195.
3. 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
4. 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
5. 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.
6. Tannous, B.A. Secreted blood reporters: insights and applications / B.A. Tannous, J. Teng // *Biotechnol Adv*. – 2011. – 29, №6. – P. 997–1003.
7. Markova, S.V. High-active truncated luciferase of copepod *Metridia longa* / S.V Markova, L.P. Burakova, E.S. Vysotski // *BBRC*. – 2012. – №412. – P. 98–103.
8. Verhaegen, M. Recombinant *Gaussia luciferase*. Overexpression, purification, and analytical application of a bioluminescent reporter for DNA hybridization / M. Verhaegen, T. Christopoulos // *Analytical Chemistry*. – 2002. – №74. – P. 4378–4385.

9. 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 // Journal of Biological Chemistry. –2004. – 279, №5. – P. 3212–3217.
10. Takenaka, Y. Two forms of secreted and thermostable luciferases from the marine copepod crustacean, *Metridia pacifica* / Y. Takenaka, H. Masuda, A. Yamaguchi, S. Nishikawa, Y. Shigeri, Y. Yoshida, H. Mizuno // Gene. – 2008. – №425. – P. 28–35.
11. Takenaka, Y. Computational analysis and functional expression of ancestral copepod luciferase / Y. Takenaka, A. Noda-Ogura, T. Imanishi, A. Yamaguchi, T. Gojobori, Y. Shigeri // Gene. – 2013. – №528. – P. 201–205
12. Маркова С. В. Целентеразин – зависимые люциферазы (обзор) / С. В. Маркова, Е. С. Высоцкий // Биохимия – 2015. – Т. 80. - №6. – С. 845-866.
13. Inouye S. Identification of two catalytic domains in a luciferase secreted by the copepod *Gaussia princeps* / S. Inouye, Y. Sahara // BBRC. – 2008. – №365. – P. 96–101.
14. 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
15. Remy I. Michnick. Application of protein-fragment complementation assays in cell biology / I. Remy, W. Stephen // 2007. – №42 – P. 138–145.
16. Shimomura, O. Bioluminescence in the sea: photoproteins systems // Symp. Soc. Exp. Biol. – 1985. – №39. – P. 305–319.
17. Villalobos, V. Current state of imaging protein-protein interactions in vivo with genetically encoded reporters / V. Villalobos, S. Naik, D. Piwnica-Worms // Annu Rev Biomed Eng. – 2007. - №9. – P.321-349.

18. Galarneau, A. Betalactamase protein fragment complementation assays as in vivo and in vitro sensors of protein protein interactions / A. Galarneau, M. Primeau, L.E. Trudeau, S.W. Michnick // *Nat. Biotechnol.* – 2002. – №20. – P.619-622.
19. Paulmurugan, R. Monitoring protein-protein interactions using split synthetic renilla luciferase protein-fragment-assisted complementation/ R. Paulmurugan, S.S. Gambhir // *Anal Chem.* – 2003. – № 75, Vol.7. – P.1584-1589
20. Remy, I. A highly sensitive protein-protein interaction assay based on Gaussia luciferase/ I. Remy, S.W. Michnick // *Nat Methods.* – 2006. – № 3., Vol.12. – P.977-979.
21. Luker, K. Optimizing luciferase protein fragment complementation for bioluminescent imaging of protein-protein interactions in live cells and animals / K. Luker, D. Piwnica-Worms // *Methods Enzymol.* – 2004. – №385. – P.349–360.
22. Chudakov, D.M. Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging / D.M. Chudakov // *Trends Biotechnol.* – 2005. – №23. – P.605–613.
23. Kaihara, A. Locating a protein–protein interaction in living cells via split *Renilla* luciferase complementation / A. Kaihara, Y. Kawai, M. Sato, T. Ozawa, Y. Umezawa // *Anal. Chem.* – 2003. – №75. – P.4176–4181.
24. Hu, C.D. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis / C.D. Hu, T.K. Kerppola // *Nat. Biotechnol.* – 2003. – №21. – P.539–545.
25. Ghosh, I. Antiparallel leucine zipper-directed protein reassembly: Application to the green fluorescent protein / I. Ghosh, A. D. Hamilton, L. Regan // *J. Am. Chem. Soc.* – 2000. – Vol.122. – P.5658-5659.
26. Lumb, K.J. Measurement of interhelical electrostatic interactions in the GCN4 leucine zipper / K.J. Lumb, P.S. Kim // *Science.* – 1995. – Vol.268. – P.436-439.

27. Lupas, A. Coiled coils: new structures and new functions / A. Lupas // Elsevier – 1996. – P.21.
28. Oakley, M.G. A buried polar interaction can direct the relative orientation of helices in a coiled coil / M.G. Oakley, P.S. Kim // Biochemistry – 1998. – Vol.37. – P.12603-12610.
29. Jiang, P. Using leucine zipper to facilitate α -synuclein assembly / P. Jiang, Ko Li-wen, K.R. Jansen, T.E. Golde, Yen Shu-Hui // FASEB – 2008. – Vol. 22. – P.3165-3174.
30. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. – №227. – P. 680–685

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт
Базовая кафедра биотехнологии
Кафедра

УТВЕРЖДАЮ

Заведующая кафедрой

 Т.Г. Волова

Подпись, инициалы фамилия

«24» июня 2022г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01. Биология

Код наименования направления

Анализ потенциала люциферазы Metridia как комплементационного
репортера для мониторинга белок-белковых взаимодействий в клетках.

тема

Руководитель


подпись, дата

к.б.н., доцент

должность, ученая степень

С. В. Маркова

инициалы, фамилия

Выпускник


Подпись, дата

А. Г. Селивёрстова

инициалы, фамилия

Красноярск 2022