

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

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

_____ _____
подпись инициалы, фамилия
« _____ » _____ 20 ____ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Получение и изучение свойств гибридного белка, включающего
одноцепочечное миниантитело 14D5a и целентеразин-зависимую люциферазу
NanoLuc

Научный руководитель	_____	<u>проф., д.б.н.</u>	<u>Л.А.Франк</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____		<u>Э.Е.Бауэр</u>
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Консультант	_____	<u>к.б.н.</u>	<u>Е.Е.Башмакова</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия

Красноярск 2022

РЕФЕРАТ

Бакалаврская работа по теме «Получение и изучение свойств гибридного белка, включающего одноцепочечное миниантитело 14D5a и целентеразин-зависимую люциферазу NanoLuc» содержит 50 страниц, 23 рисунка, 2 таблицы, 11 использованных источников.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), гибридный белок, миниантитело 14D5a, люцифераза NanoLuc, иммуноанализ, биолюминесценция.

Цель: получить гибридный белок 14D5a–NanoLuc экспрессией в рекомбинантных клетках штамма *E. coli* и изучить его свойства как биолюминесцентной метки для выявления ВКЭ.

Задачи: получить генетическую конструкцию, кодирующую целевой белок 14D5a-NanoLuc; синтезировать целевой гибридный белок в рекомбинантных клетках *E. coli*; получить препарат белка 14D5a-NanoLuc высокой очистки и изучить его основные биолюминесцентные свойства; исследовать 14D5a-NanoLuc как биоспецифичный репортер в модельном твердофазном иммуноанализе ВКЭ.

Актуальность данной темы обусловлена необходимостью разработки подходов, которые обеспечивают надежный и быстрый анализ выявления ВКЭ, пригодный для рутинного применения.

Получена генетическая конструкция, кодирующая гибридный белок 14D5a-NanoLuc и рекомбинантные клетки *E. coli* Rosetta Gami 2, несущие плазмиду pFLAG-14D5a-NanoLuc; целевой гибридный белок выделен из биомассы рекомбинантных клеток и очищен с помощью металл-аффинной хроматографии; исследованы биолюминесцентные свойства гибридного белка в сравнении с таковыми рекомбинантной люциферазы NanoLuc дикого типа; исследована способность полученного белка связывать гликопротеин Е ВКЭ.

Полученный гибридный белок является бифункциональным: обладает способностью связывать белок Е ВКЭ и биолюминесцентной активностью люциферазы NanoLuc и может быть использован в иммуноанализе ВКЭ.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. Обзор литературы.....	8
1.1 Вирус клещевого энцефалита	8
1.1.1 Клещевой энцефалит	10
1.1.2 Способы выявления вируса клещевого энцефалита в современных лабораториях.....	13
1.2 Явление биолюминесценции	13
1.2.1 Целентеразин-зависимые биолюминесцентные системы.....	14
1.2.2 Применение целентеразин-зависимых люцифераз как репортеров для выявления ВКЭ.....	17
2. Материалы и методы исследования	21
2.1 Вещества и реактивы	21
2.2 Создание генетической конструкции с геном гибридного белка 14D5a-NanoLuc	22
2.3 Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i> Rosetta Gami 2	23
2.4 Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i> XL1-Blue плазмидной ДНК и ПЦР-скрининг колоний	23
2.5 Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i> плазмидной ДНК.....	24
2.6 Экспрессия гибридного белка.....	25
2.7 Выделение целевого гибридного белка	25
2.8 Металл-хелатная хроматография на HisTrap™ HP	25
2.9 Выделение рекомбинантной люциферазы NanoLuc дикого типа.....	26
2.10 Зависимость биолюминесценции гибридного белка от концентрации субстрата (целентеразина).....	26
2.11 Предел обнаружения целевого белка.....	27
2.12 Сравнение удельной активности целевого гибридного белка и дикого NanoLuc	27
2.13 Выделение и очистка домена D3 рекомбинантного гликопротеина E ВКЭ28	
2.14 Взаимодействие полученного гибридного белка с доменом D3 гликопротеина E ВКЭ	28
3 Результаты и обсуждение.....	30

3.1 Получение генетической конструкции с геном гибридного белка 14D5a-NanoLuc	30
3.2 Получение гибридного белка и люциферазы NanoLuc дикого типа	30
3.3 Зависимость биолюминесценции гибридного белка от концентрации субстрата (целентеразина).....	30
3.4 Предел обнаружения целевого белка.....	30
3.5 Сравнение удельной активности целевого гибридного белка и дикого NanoLuc	30
3.6 Выделение домена D3 гликопротеина E ВКЭ.....	30
3.7 Взаимодействие полученного гибридного белка с доменом D3 гликопротеина E ВКЭ	30
4. Выводы	48
Список сокращений	49
Список использованных источников	50

ВВЕДЕНИЕ

Гибридные (химерные или слитые) белки представляют собой искусственные белки, полученные путем слияния нескольких ДНК, кодирующих «родительские» белки или олигопептиды в одной рамке считывания - т.е. подряд, без промежуточных стоп-кодонов. Эта ДНК экспрессируется в клетках-хозяевах (обычно в микробах), и полученный белок одновременно проявляет свойства «родительских» белков или олигопептидов.

Гибридный белок, у которого один из доменов обладает способностью специфично связываться с молекулой-мишенью, а другой является ферментом с визуально-регистрируемым продуктом (репортером), конструируют для применения в качестве специфичной метки в молекулярном анализе. Показано, что в качестве эффективного репортера можно использовать ферменты — люциферазы, одним из продуктов которых является свет.

NanoLuc представляет собой искусственную целентеразин-зависимую люциферазу с массой 19,1 кДа, созданную американской компанией Promega на основе люциферазы из глубоководной креветки *Oplophorus gracilirostris* [1]. Билюминесценция NanoLuc при использовании нового синтетического аналога целентеразина — фуримазина, существенно ярче, чем билюминесценция люциферазы светлячка или мягкого коралла *Renilla*, что обеспечивает превосходную чувствительность анализа с использованием NanoLuc в качестве репортера. Будучи небольшим по размеру, этот белок хорош для экспериментов, требующих небольшого репортера (например, вирусных геномов). Кроме того, характеристики свечения и другие физико-химические свойства NanoLuc делают его идеальным репортером для анализа времени жизни белка и внутриклеточной стабильности. Превосходная яркость билюминесценции и нетоксичность такой системы позволяют проводить видеоанализ транслокации белков в живых клетках с использованием билюминесцентной визуализации. В совокупности особенности NanoLuc делают его универсальным репортером для анализа регуляции транскрипции

или динамики внутриклеточных белков.

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) является возбудителем одной из самых тяжелых нейроинфекций человека и животных. Клещевой энцефалит — природно-очаговая вирусная инфекция, характеризующаяся интоксикацией, лихорадкой и поражением серого вещества головного мозга и/или оболочек головного и спинного мозга (менингит и менингоэнцефалит). Заболевание может привести к стойким неврологическим и психиатрическим осложнениям и даже к смерти больного. Люди и животные заражаются энцефалитом через укусы зараженных этим вирусом иксодовых клещей. Вирус клещевого энцефалита может быть обнаружен в крови, начиная с первой фазы заболевания. Лабораторный диагноз обычно основывается на обнаружении специфических IgM либо в крови, либо в спинномозговой жидкости, которые выявляются во второй фазе. Важной рекомендацией является выявление ВКЭ в клещах после укуса с целью своевременной диагностики и терапии заболевания. Такое выявление проводят в лаборатории с помощью иммуноанализа экстракта клещей, либо анализа на основе ПЦР.

Ранее в лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН была показана перспективность проведения такого анализа с использованием в качестве метки гибридного белка, состоящего из высокоспецифичного мышинового миниантитела к ВКЭ (14D5a) и целентеразин-зависимой люциферазы *Renilla reniformis* (Rm7).

Целью настоящей работы является получение гибридного белка, включающего миниантитело к ВКЭ и люциферазу NanoLuc (14D5a–NanoLuc), экспрессией соответствующего гена в рекомбинантных клетках штамма *E. coli* и изучение его свойств как перспективной, более чувствительной биолюминесцентной метки для выявления ВКЭ в гомогенном варианте анализа.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Получить и проанализировать генетическую конструкцию, кодирующую целевой гибрид 14D5a-NanoLuc.

2. Синтезировать целевой гибридный белок в рекомбинантных клетках *E. coli*, несущих плазмиду с геном целевого гибридного белка.
3. Получить препарат белка 14D5a-NanoLuc высокой очистки и изучить его основные биолюминесцентные свойства.
4. Получить рекомбинантный вариант белка-домена D3 гликопротеина E ВКЭ для использования в качестве модельной мишени в иммуноанализе.
5. Исследовать 14D5a-NanoLuc как биоспецифичный репортер в модельном твердофазном иммуноанализе.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Вирус клещевого энцефалита

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) является возбудителем клещевого энцефалита (КЭ), потенциально смертельной неврологической инфекции, поражающей людей в Европе и Азии. ВКЭ относится к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*. Входит в группу клещевых флавивирусов млекопитающих, к которой, наряду с другими генетически и антигенно родственными вирусами, относятся вирус омской геморрагической лихорадки, вирус Лангата и вирус геморрагической лихорадки Алхурма.

Семейство *Flaviviridae* включает в себя 4 рода: *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pestivirus* и *Reovirus*. Патогенными для человека являются вирусы двух родов: рода *Hepacivirus* и рода *Flavivirus*. Род *Flavivirus* включает возбудителей клещевого энцефалита, японского энцефалита, омской геморрагической лихорадки, лихорадки денге и др.

Международная классификация флавивирусов делит ВКЭ на дальневосточный (штамм Софбин), сибирский и западноевропейский подтипы. Они были названы по преимущественному распространению в Евразии.

Вирус клещевого энцефалита имеет сферическую форму. Вирион состоит из нуклеокапсида, окруженного мембраной, состоящей из липидов хозяина, в которую встроены вирусная оболочка и мембранные белки. Зрелые вирионы имеют диаметр около 40-60 нм (рисунок 1).

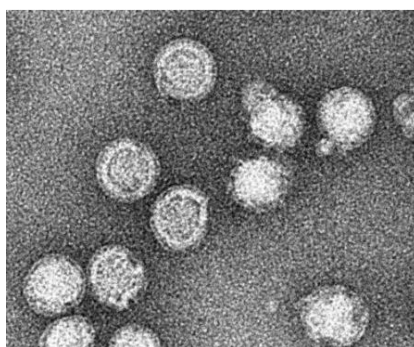


Рисунок 1 – Вирус клещевого энцефалита, электронная микроскопия.
http://elib.usma.ru/bitstream/usma/1037/1/UMK_2017_005.pdf

Геном ВКЭ включает одноцепочечную РНК с положительным смыслом длиной приблизительно 11 тысяч п.н., содержащую 5'-кэп и лишенную полиаденилатного хвоста. 5'-кэп важен для стабильности и трансляции мРНК. Единая открытая рамка считывания кодирует три структурных белка — капсидный белок С, мембранный белок М (образованный путем отщепления от его предшественника ргМ) и гликопротеин большой оболочки Е — и семь неструктурных белков — NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B и NS5 (РНК-зависимая полимеразы). Вирусная геномная РНК сама по себе является инфекционной и будет производить вирусное потомство, если ее ввести в восприимчивые клетки [8].

Основным поверхностным белком флавивирусов является белок оболочки Е, который существует на поверхности вируса в виде гетеродимера с белком вирусной мембраны М. Белок Е разделен на три отдельных домена (D1, D2, D3), которые можно различить как серологически, так и в рамках рентгеновской кристаллической структуры. Домен D3 белка Е является высокоантигенным, состоит в основном из линейных эпитопов. Он был предложен в качестве домена, связывающего вирусный рецептор, на основании кристаллографических данных, картирования нейтрализующих моноклональных антител и прямых исследований связывания клеток.

Схематическое изображение вируса клещевого энцефалита представлено на рисунке 2.

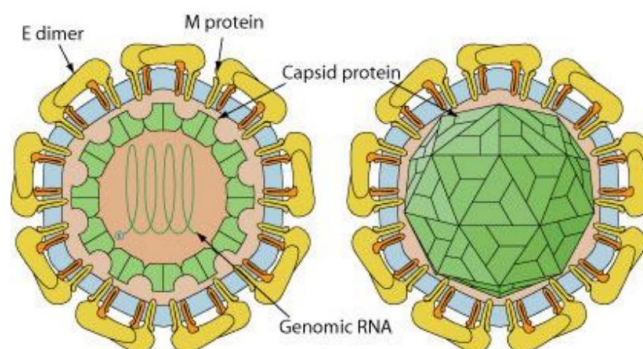


Рисунок 2 – Схема строения вируса клещевого энцефалита. E-dimer – белок Е, состоящий из двух молекул, М protein – белок М, Capsid protein – капсидный белок, Genomic RNA – геномная РНК. http://elib.usma.ru/bitstream/usma/1037/1/UMK_2017_005.pdf

Благодаря липидной оболочке ВКЭ легко инактивируется органическими растворителями и детергентами; быстро инактивируется при 50°C, 50% инфекционности теряется через 10 мин. Полная инактивация вируса, взвешенного в крови или других белковых растворах, происходит в течение 30 мин при 56°C. ВКЭ инактивируется ультрафиолетовым светом, гамма-облучением и дезинфицирующими средствами, в том числе 3-8% формальдегидом, 2% глутаральдегидом, 2-3% перекисью водорода, спиртом и 1% йодом.

В лиофилизированной форме вирус неограниченно долго сохраняется при комнатной температуре [9].

1.1.1 Клещевой энцефалит

Клещевой энцефалит — вирусное инфекционное заболевание, поражающее центральную нервную систему. Заболевание чаще всего проявляется в виде менингита, энцефалита или менингоэнцефалита. Встречаются также миелит и спинальный паралич. Заболевание может привести к стойким неврологическим осложнениям и даже к смерти больного.

В 1937 году отечественные ученые Л. А. Зильбер, М. П. Чумаков, А. К. Шубладзе, Е. Н. Левкович, В. Д. Соловьев выделили вирус-возбудитель клещевого энцефалита и показали путь передачи: от грызунов, являющихся резервуаром вируса, через иксодовых клещей, основных переносчиков клещевого энцефалита. Первое клиническое описание болезни дали в 1936-1940 гг. отечественные ученые И. С. Глазунов, М. Б. Кроль, А. Г. Панов, А. Н. Шаповал [3].

Люди являются случайными хозяевами. Заражение может произойти при укусе инфицированного клеща или при употреблении непастеризованного молока, инфицированного ВКЭ, поскольку вирус обладает высокой устойчивостью к кислотности желудка.

Как и в случае многих арбовирусов, большинство инфекций ВКЭ

протекает бессимптомно. Долю этих случаев трудно установить, потому что люди с легкими симптомами/признаками могут быть не диагностированы, но данные свидетельствуют о частоте от 70% до 98%.

Симптоматическая инфекция встречается во всех возрастных группах. Инкубационный период (временной интервал от укуса клеща до начала заболевания) обычно составляет от 7 до 14 дней, но может варьировать от 2 до 28 дней.

Примерно у двух третей больных заболевание, вызванное европейским подтипом вируса, имеет характерное двухфазное течение, тогда как у остальных - монофазное. Большинство пациентов с монофазным течением имеют поражение центральной нервной системы, тогда как у незначительного меньшинства наблюдается лихорадочное заболевание с головной болью, но без менингита.

Начальная вирусемическая фаза обычно проявляется неспецифическими симптомами, такими как умеренная лихорадка (99%), утомляемость (63%), общее недомогание (62%), головная боль и боль в теле (54%). В начальной фазе КЭ лейкопения (снижение лейкоцитов в крови), а также тромбоцитопения (уменьшение количества тромбоцитов в крови) выявляются примерно у 70% больных, тогда как результаты печеночных проб с отклонениями от нормы встречаются относительно редко. Эта фаза сохраняется в течение 2-7 дней, после чего следует улучшение или даже бессимптомный период продолжительностью около 1 недели (диапазон 1-21 день). Затем развивается вторая лихорадочная фаза, которая проявляется менингитом примерно у 50% взрослых пациентов, менингоэнцефалитом примерно у 40% и менингоэнцефаломиелитом примерно у 10%.

Менингит является наиболее распространенной клинической формой КЭ. Обычно проявляется высокой температурой, головной болью, тошнотой, рвотой и головокружением. Признаки раздражения мозговых оболочек обычно возникают, но могут быть не выражены.

Энцефалит характеризуется нарушением сознания от сонливости до

сопора и, в редких случаях, комы. Другие симптомы включают беспокойство, тремор конечностей и фасцикуляции языка, нарушение концентрации внимания и когнитивных функций, редко асимметричное поражение черепно-мозговых нервов (преимущественно глазных и лицевых). У отдельных больных могут развиваться делирий и психоз.

Менингоэнцефаломиелит — наиболее тяжелая форма заболевания. Для него характерны вялые парезы, которые обычно развиваются в лихорадочную фазу болезни. Возникновению парезов иногда предшествуют сильные боли в руках, спине и ногах (рисунок 3). Верхние конечности поражаются чаще, чем нижние, а проксимальные отделы чаще, чем дистальные. Пациентам с парезами дыхательных мышц может потребоваться искусственная вентиляция легких, чтобы выжить. Очень редко миелит возникает как единственное проявление болезни. Поражение продолговатого мозга и центральных отделов ствола головного мозга связано с неблагоприятным прогнозом.



Рисунок 3 – Последствия клещевого энцефалита - паралич верхних конечностей.
http://elib.usma.ru/bitstream/usma/1037/1/UMK_2017_005.pdf

Иногда КЭ может быть связан с дисфункцией вегетативной нервной системы с последующей выраженной вариабельностью сердечного ритма.

Абортивная форма КЭ — редкое клиническое проявление ВКЭ-инфекции. Проявляется фебрильной головной болью без поражения мозговых оболочек (т. е. начальной фазой болезни без последующего поражения ЦНС). Лихорадка обычно держится 3-7 дней, прогноз отличный. Данные об абортивной форме инфекции КЭ ограничены [10].

1.1.2 Способы выявления вируса клещевого энцефалита в современных лабораториях

Лабораторные методы являются ведущим фактором в диагностике ВКЭ. Как правило, антитела классов IgM и IgG к ВКЭ обычно присутствуют в первых образцах сыворотки крови, когда симптомы со стороны ЦНС проявляются во второй фазе заболевания.

В первой фазе заболевания вирус может быть выделен или обнаружен с помощью ОТ-ПЦР из крови, но лишь в редких случаях ВКЭ выявляется в начале второй фазы в спинномозговой жидкости и иногда в случаях прогрессирования заболевания. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) выявляет специфические фрагменты генома вируса на ранних сроках болезни.

Для специфической серодиагностики обычно используют иммуноферментный анализ; который может быть основан либо на очищенных вирионах, либо на рекомбинантных вирусоподобных частицах, полученных путем экспрессии белков rгМ и Е.

Также методами ИФА и ОТ-ПЦР можно исследовать клеща на наличие антигена. Модельный твердофазный иммуноанализ ВКЭ у лабораторно выращиваемых клещей позволяет обнаружить почти 10^4 – 10^5 вирусных частиц или около 0,1 пг вирионов.

Эти методы позволяют исследовать одновременно большое количество биологического материала (сыворотка или плазма крови человека, спинномозговая жидкость или различные биопробы, в том числе клещи) в течение 2,5–3 часов.

1.2 Явление биолюминесценции

Биолюминесценция — это испускание видимого света организмом в результате естественной химической реакции. Биолюминесценция была обнаружена у широкого круга основных групп организмов, от бактерий и простейших до кальмаров и рыб, с многочисленными промежуточными

типами. В большинстве этих случаев люминесценция производится самими организмами, а не бактериальными симбионтами.

Удивительное разнообразие морских животных и микробов способно излучать собственный свет, и в большей части объема океана биолюминесценция является основным источником света. В пресной воде люминесценция почти отсутствует, за исключением некоторых пресноводных моллюсков и личинок некоторых насекомых. На суше наиболее яркими примерами биолюминесценции являются светлячки.

Учитывая широкое распространение, биолюминесценция, несомненно, является преобладающей формой коммуникации, оказывая важное влияние на огромную ежедневную миграцию, взаимодействие хищник-жертва и поток материала через пищевую сеть.

Считается, что биолюминесценция впервые возникла на стадии перехода от анаэробных форм жизни к аэробным. Это неудивительно, поскольку цель эволюции - не что иное, как выживание и процветание вида.

1.2.1 Целентеразин-зависимые биолюминесцентные системы

Наибольшее разнообразие биолюминесцентных организмов встречается в морских экосистемах. В море часто тот же люциферин, целентеразин, служит субстратом для многочисленных независимо развившихся люцифераз в филогенетически отдаленных группах организмов. Целентеразин представляет собой модифицированный трипептид, продуцируемый из одного остатка фенилаланина и двух остатков тирозина, однако гены, участвующие в его биосинтезе, а также точный путь биосинтеза в настоящее время неизвестны. Большинство морских организмов не синтезируют целентеразин сами, а получают его из пищи. Считается, что эти соединения синтезируются в организме представителей светящихся ракообразных – копепод и остракод семейства Cypridinidae, а в биолюминесцентные организмы поступают по пищевой цепи (показано для рыбы *Porichthys notatus* и медузы *Aequorea*).

Все целентеразин-зависимые природные системы излучают синий свет с максимумами излучения в диапазоне 450–500 нм и обычно не требуют каких-либо кофакторов, кроме кислорода. В некоторых случаях цвет биолюминесценции изменяется под действием флуоресцентного белка, взаимодействующего с люциферазой. Другие характеристики, такие как молекулярная масса, рН-чувствительность, термостабильность и скорость катализа люцифераз, сильно различаются среди целентеразин-зависимых систем. Ниже представлено несколько практически важных люцифераз, использующих целентеразин или его аналоги.

Люцифераза *Renilla*: цитозольный белок среднего размера (36 кДа) из коралла, который производит устойчивый люминесцентный сигнал. Раннее открытие, а также наличие инженерных версий с повышенной яркостью и спектрами с красным смещением, сделали эту систему популярной для биомедицинских приложений, в частности, для биоимиджинга и скрининга лекарств.

Люцифераза *Gaussia*: небольшой (20 кДа) секретлируемый белок, продуцируемый небольшим ракообразным из группы *Copepoda*, с высокой скоростью катализа и исключительной термостабильностью. Активность белка зависит от образования дисульфидных связей, что делает его непригодным для некоторых гетерологичных систем. Сигнал люциферазы *Gaussia* линейно зависит от количества анализируемых клеток, что делает эту систему полезной для мониторинга прогрессирования опухоли и ответа на лекарство.

Люцифераза *Nanoluc*: модифицированный вариант люциферазы креветки *Oplophorus gracilirostris*. Этот небольшой (19,1 кДа) белок использует проникающий в клетку аналог целентеразина, не имеет дисульфидных связей и дает яркий сигнал, пригодный для широкого спектра применений. Слияния с флуоресцентными белками приводят к получению ярких сконструированных биолюминесцентных конструкций со спектрами, смещенными в красную сторону, облегчающими биолюминесцентную визуализацию отдельных клеток и всего тела *in vivo*. Одним из недостатков этой системы является высокая

стоимость реагентов [7].

В лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН более 30 лет исследуются биолюминесцентные системы различных светящихся организмов. Изучение целентеразин-зависимых биолюминесцентных систем является одним из основных направлений этих исследований. Накоплены обширные данные об устройстве и функционировании целентеразин-зависимых биолюминесцентных систем различных организмов, среди них: фотопротеины *Obelia longissima*, *O. geniculata*, *Clytia gregaria*, *Beroe abyssicola*, а также люциферазы *Renilla muelleri*, *Metridia longa* и др. Одним из важнейших направлений является разработка способов аналитического использования биолюминесцентных белков как репортеров в медицинской диагностике. Перспективность этих разработок обусловлена прежде всего тем фактом, что биолюминесцентные реакции в сравнении с хемилюминесцентными обладают высоким квантовым выходом и низким уровнем шума, что может обеспечить высокую (сравнимую с изотопной меткой) чувствительность анализа на их основе [4].

Целентеразин-зависимые люциферазы являются ключевыми элементами биолюминесцентных систем разнообразных светящихся организмов, обитающих в мировом океане. Объединение этих люцифераз в одну группу связано с тем, что они, имея различное строение, катализируют окисление молекулярным кислородом одного и того же субстрата – целентеразина (CTZ, рис. 4).

Различают два типа биолюминесцентных систем: люциферазы, катализирующие декарбоксилирование CTZ в соответствии с классической фермент-субстратной кинетикой (рисунок 4, а), и фотопротеины, биолюминесцентная реакция которых протекает в две стадии (рисунок 4, б).

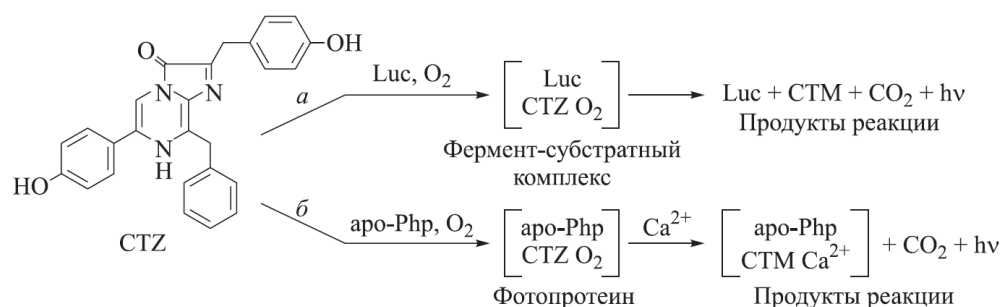


Рисунок 4 – Два типа целентеразин-зависимых биолюминесцентных систем. CTZ – целентеразин; Luc – люцифераза; CTM – целентерамид; apo-Phr – апофотопротеин. Frank L.A., Bashmakova E.E., Krasitskaya V.V., Kudryavtsev A.N. Genetically modified coelenterazine-dependent luciferases as reporters for in vitro assay // J. of Siberian Federal Univ. Biology. 2017. V. 10 (2). P. 199–210.

Вначале апофотопротеин катализирует окисление CTZ кислородом с образованием гидропероксидного производного, прочно, но нековалентно иммобилизованного в гидрофобную полость белка. Этот комплекс называется «фотопротеин», и его особым свойством является высокая стабильность. Полипептидная цепь фотопротеина содержит три Ca^{2+} -связывающих сайта EF-hand типа. Ничто, кроме связывания Ca^{2+} , не вызывает быстрого распада фотопротеина с образованием кванта света, CO_2 и целентерамида, связанного с белком. Так, в отличие от люциферазы, биолюминесценция фотопротеина не зависит от кислорода и происходит в виде одиночной вспышки. Поскольку фотопротеин принимает непосредственное участие в реакции, количество испускаемого света всегда пропорционально его содержанию (при насыщающей концентрации Ca^{2+}) [11].

1.2.2 Применение целентеразин-зависимых люцифераз как репортеров для выявления ВКЭ

Светоизлучающие белки – люциферазы и фотопротеины – широко используются как репортеры для высокочувствительного молекулярного анализа *in vitro* и *in vivo*. Соединение (конъюгирование) люциферазы с молекулами, обладающими аффинностью к определенным мишеням (иммуноглобулинами, олигонуклеотидами, гаптенами и пр.), обеспечивает

специфичность анализа.

Гибридные (химерные или слитые) белки представляют собой искусственные белки, генетически полученные путем слияния нескольких ДНК, кодирующих «родительские» белки или олигопептиды в одной рамке считывания - т.е. подряд, без промежуточных стоп-кодонов. Эта ДНК экспрессируется в клетках-хозяевах (обычно в микробах), и полученный белок одновременно проявляет свойства «родительских» белков или олигопептидов.

Гибриды условно можно разделить на две группы:

1. Гибриды целевого белка и вспомогательного полипептида
2. Многофункциональные гибриды

Многофункциональные гибриды состоят из нескольких доменов, каждый из которых является ценным. Биоспецифическая активность доменов у гибридов обычно близка к активности исходных белков, тогда как химический синтез многофункциональных белков неизбежно повреждает активность из-за неспецифичности реагентов.

Практический интерес к светоизлучающим белкам обусловлен высоким квантовым выходом реакций, катализируемых люциферазами, и высоким отношением сигнал/шум, что потенциально обеспечивает высокую чувствительность анализов, основанных на этих ферментах в качестве репортеров [5].

Для выявления ВКЭ, разработан иммуноанализ на основе биолюминесцентного гибридного белка 14D5a-Rm7 в качестве детектора обнаружения. В его состав входят: распознающий элемент – одноцепочечное миниантитело мыши 14D5a против белка Е ВКЭ, состоящее из переменных доменов тяжелой и легкой цепей (V_H и V_L), соединенных гибким линкером, и сигнальный элемент – термостабильный вариант люциферазы мягкого коралла *Renilla muelleri* (Rm7), способный генерировать световой сигнал при добавлении субстрата – целентеразина. Гибридный белок применяли в качестве метки для твердофазного иммуноанализа антигенов, связанных с вирусом клещевого энцефалита (природный гликопротеин Е или экстракты зараженного

штамма лабораторных клещей).

Традиционными методами обнаружения ВКЭ являются:

1. Метод колориметрического иммуноанализа
2. Метод на основе ПЦР с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР)

ИФА — это метод анализа на планшетах, предназначенный для обнаружения и количественного определения растворимых веществ, таких как пептиды, белки, антитела и гормоны. В иммуноферментном анализе антиген (макромолекула-мишень) иммобилизуется на твердой поверхности (микропланшете), а затем образует комплекс с антителом, связанным с репортерным ферментом. Обнаружение осуществляется путем измерения активности репортерного фермента посредством инкубации с соответствующим субстратом для получения измеряемого продукта. Наиболее важным элементом ИФА является высокоспецифичное взаимодействие антитело-антиген.

Биолюминесцентным ИФА для выявления ВКЭ является «сэндвич»-метод (рисунок 5). Он проводится с использованием непрозрачных микротитрационных планшетов.

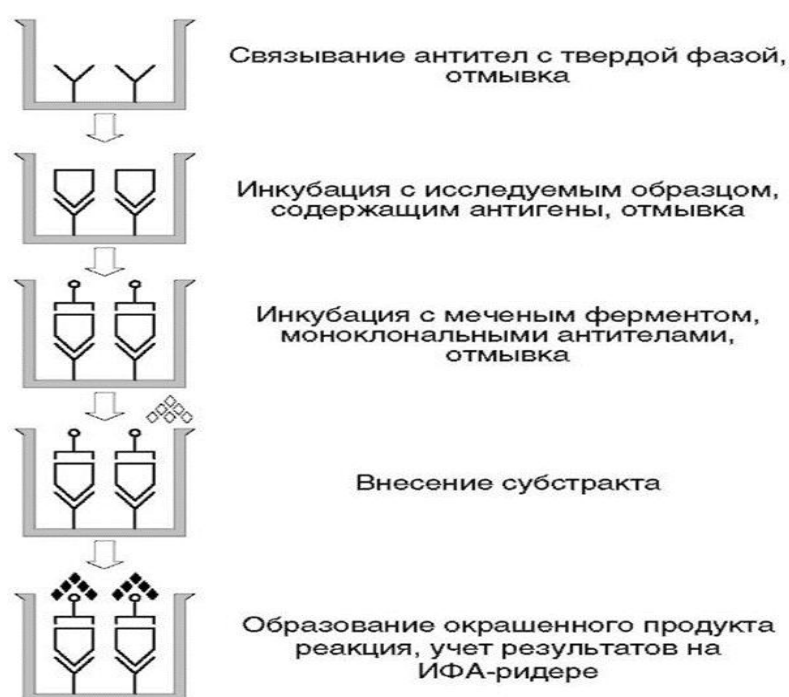


Рисунок 5 – Схема ИФА «сэндвич»-метод. https://studopedia.ru/8_5283_ingibitorniy-

Поверхность лунок для микротитрования активируется раствором мышинового моноклонального антитела 14D5a. В лунки добавляют антиген - гликопротеин E, либо экстракт природного клеща. В процессе инкубации образуется комплекс антиген-антитело. Остальные компоненты образца отмываются. Добавляют раствор гибридного белка 14D5a-Rm7. Не связавшиеся компоненты удаляют отмывкой. На стенках лунки формируется «сэндвич» из двух антител и антигена, содержащий также фермент люциферазу. Билюминесценцию измеряют немедленно с помощью планшетного люминометра после впрыска свежеприготовленного раствора целентеразина.

Билюминесцентный анализ демонстрирует высокую чувствительность (0,056 нг гликопротеина E; 10^4 – 10^5 вирусных частиц или 0,1 пг вирионов) и простоту и является конкурентоспособным с традиционными методами обнаружения ВКЭ [2].

Таким образом, обзор литературы показывает возможность использования гибридных белков, основанных на целентеразин-зависимых люциферазах, в билюминесцентных анализах. Из чего следует, что поставленные цель и задачи необходимы для получения высокоочищенного целевого белка, который затем можно будет использовать в качестве специфичной метки для определения вируса клещевого энцефалита.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Вещества и реактивы

Таблица 1 – Состав буферных растворов и сред, используемых в работе

Название	Состав
LB-агар	1,5% агара в LB-среде
LB-среда	20 г/л бакто-триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 5-7 г/л NaCl, pH 7,4
Mg ²⁺ /Ca ²⁺ раствор	80 mM MgCl ₂ , 20 mM CaCl ₂
SOC-среда	20 г/л бакто-триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0,6 г/л NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , pH 7,0 + 20 mM глюкозы
Буфер PBS	0,1 M K-Na-фосфат pH 7.0; 0,15 M NaCl
Буфер TGB	25 mM Tris-base, 250 mM глицина, 0,1% SDS
Буфер А	50 mM K-Na-фосфат pH 7.0, 0,3 mM NaCl и 5 mM имидазол
Буфер Б	Буфер А, содержащий 0,5 M имидазол
Раствор для промывки планшета	0,1 M K-Na-фосфат pH 7.0; 0,15 M NaCl, 0,1 Tween 20, 5 mM ЭДТА

В работе использованы следующие реактивы: бактотриптон (Panreac, Испания), дрожжевой экстракт (BD Biosciences, США), агар бактериологический, агароза LE, изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (ДИА-М, Россия), Tris-base, кальция хлорид, ЭДТА-натриевая соль, мочеви́на (Sigma-Aldrich, США) бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma-Aldrich, США). Для электрофореза белков использовали акриламид, бис-акриламид (Медиген, Россия), ТЕМЕД (Helicon, Россия), додецилсульфат натрия, персульфат аммония (Bio-Rad, США), стандартные смеси белков для

заключительная стадия – 7 мин при 72°C. Через 5 циклов добавили праймер Up NotI (GGS)₄, который описан выше.

Продукт амплификации расщепляли ферментами рестрикции NotI (изошизомер NotI – CsiNI) и EcoRI (СибЭнзим, Россия) в течение 2 ч при 37°C.

ДНК векторной плазмиды pFLAG-sc14D5a-Rm7 обработали ферментами рестрикции NotI и EcoRI аналогично, после чего дефосфорилировали с помощью щелочной фосфатазы CIP (NEB, США). ПЦР-фрагмент и линейаризованный вектор очищали электрофоретически и проводили лигирование. Полученной лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* XL1-Blue. Клоны, содержащие вставку нужного размера, отбирали с помощью ПЦР. Последовательность полученной ДНК pFLAG-sc14D5a-NanoLuc подтверждали секвенированием в ЦКП «Геномика» СО РАН (Новосибирск, Россия).

2.3 Приготовление компетентных клеток *E. coli* Rosetta Gami 2

В колбу с LB-средой перенесли несколько колоний Rosetta Gami 2 и инкубировали клетки до оптической плотности при длине волны 600 нм $OP_{600}=0.3-0.4$, после чего перенесли клетки на лед на 5 мин. Разделили культуру на две пробирки по 25 мл, центрифугировали 3000g, 10 мин, 4°C. Супернатант сливали. Каждую пробирку мягко ресуспендировали холодным Mg^{2+}/Ca^{2+} раствором (таблица 1). Перенесли пробирки на 30 мин на лед, после чего центрифугировали при 3000g, 10 мин, 4°C. Супернатант сливали. Ресуспендировали каждую пробирку холодным раствором 100 мМ $CaCl_2$, после чего перенесли пробирки на лед на 20 мин. Объединили содержимое двух пробирок и добавили холодный 80%-ный глицерол. Клетки хранили при -80°C.

2.4 Трансформация компетентных клеток *E. coli* XL1-Blue плазмидной ДНК и ПЦР-скрининг колоний

К суспензии компетентных клеток *E. coli* XL1-Blue (43 мкл) добавили 7

мкл плазмидной ДНК, инкубировали на льду в течение 30 мин, затем на водяной бане WB-4MS («Biosan», Латвия) проводили тепловой шок (прогревали 45 сек при 42°C) и снова переносили на лед. После этого в пробирку добавляли 450 мкл SOC-среды, инкубировали в термостате 1 час при 37°C, высевали на LB-агар с ампициллином (200 мкг/мл) и растили при 37°C.

Выросшие колонии отбирали и ресуспендировали в 20 мкл деионизированной воды, одновременно пересевая в новую чашку, после чего инкубировали 10 мин при 95°C и центрифугировали 2 мин при 13000g. Анализ размера вставок проводили ПЦР-скринингом, используя 8 мкл клеточной смеси, Taq ДНК-полимеразу и rFLAG-CTS праймеры для секвенирования:

Up 5' - CATCATAACGGTTCTGGCAAATATTC-3'

Dn 5' - CTGTATCAGGCTGAAAATCTTCTC-3'

Условия ПЦР: 95°C в течение 1 мин; 25 циклов (95°C – 30 с, 56°C – 30 с, 72°C – 1 мин); 72°C в течение 7 мин.

Концентрацию и молекулярный вес ПЦР-продуктов определяли с помощью аналитического гель-электрофореза в 1% агарозном геле.

2.5 Трансформация компетентных клеток *E. coli* плазмидной ДНК

К суспензии компетентных клеток *E. coli* Rosetta Gami 2 (49 мкл) добавили 1 мкл плазмидной ДНК, содержащей ген целевого белка, в течение 30 мин инкубировали на льду, затем проводили тепловой шок (прогревали 45 сек при 42°C) на водяной бане WB-4MS («Biosan», Латвия) и снова переносили на лед. После этого в пробирку добавляли 450 мкл SOC-среды, инкубировали в термостате 1 час при 37°C, высевали на LB-агар с ампициллином (200 мкг/мл) и растили при 37°C.

К суспензии компетентных клеток *E. coli* RIPL (45 мкл) добавили 1 мкл плазмидной ДНК, содержащей ген люциферазы NanoLuc, в течение 30 мин инкубировали на льду, затем проводили тепловой шок (прогревали 45 сек при 42°C) на водяной бане WB-4MS («Biosan», Латвия) снова переносили на лед.

После этого в пробирку добавляли 450 мкл SOC-среды, инкубировали в термостате 1 час при 37°C, высевали на LB-агар с ампициллином (200 мкг/мл) и растили при 37°C.

2.6 Экспрессия гибридного белка

В колбу, содержащую 250 мл LB-среды (таблица 1) и 200 мг/мл ампициллина, добавили несколько колоний *E. coli* Rosetta Gami 2, содержащих плазмиду pFLAG-14D5a-NanoLuc, и инкубировали в термошейкере при 220 об/мин, 37°C до ОП₆₀₀=0,6. Далее клетки индуцировали 0,5 mM ИПТГ и наращивали в термошейкере ночь при 23°C. Клетки осаждали центрифугированием 5000g, 10 мин при 4°C.

2.7 Выделение целевого гибридного белка

Рекомбинантные клетки с содержащимся в них гибридным белком 14D5a-NanoLuc разрушали ультразвуком на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т («Академприбор», Украина) 8 раз по 20 сек, на льду. Далее центрифугировали полученную смесь 15 мин при 4500g, супернатант перенесли в другую пробирку и центрифугировали его при 6000g, 15 мин, 4°C.

2.8 Металл-хелатная хроматография на HisTrap™ HP

Гибридный белок очищали с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии на хроматографической системе низкого давления BioLogic LP (Bio-Rad, США) с использованием колонки HisTrap™ HP ("GE Healthcare", США). Хроматографическую очистку проводили в градиенте концентраций имидазола в буфере Б (таблица 1). Целевой белок элюировали 0,125 M имидазола.

Для очистки целевого белка от имидазола концентрат фракции после хроматографии с высокой биоллюминесцентной активностью наносили на

колонку HiTrap Desalting ("GE Healthcare", США), уравновешенную двумя объемами буфера PBS, и хроматографировали тем же буфером при давлении 0,5 мПа, скорости потока 1 мл/мин.

2.9 Выделение рекомбинантной люциферазы NanoLuc дикого типа

В колбу, содержащую 200 мл LB-среды и 200 мг/мл ампициллина, добавили несколько колоний *E. coli RIPL*, содержащих плазмиду pET22b-NanoLuc, и инкубировали в термошейкере при 220 об/мин, 37°C до ОП₆₀₀=0.6. Далее клетки индуцировали 1 mM ИПТГ и наращивали в термошейкере ночь при 23°C.

Клетки осаждали центрифугированием при 6000g, 10 мин при 4°C, супернатант сливали. Затем ресуспендировали 10 мл 20 mM TrisHCl pH 8.0, разрушали ультразвуком на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т («Академприбор», Украина) 8 раз по 20 сек на льду. Центрифугировали полученную смесь 30 мин при 6000g, к супернатанту добавили 1% стрептомицин сульфат и центрифугировали при 10000g, 20 мин, 4°C.

Затем проводили диализ раствора NanoLuc против буфера, содержащего 20 mM TrisHCl pH 8.0.

NanoLuc очищали с помощью ионообменной хроматографии на жидкостном хроматографе АКТА Purifier ("GE Healthcare", США) с использованием колонки Q Sepharose® Fast Flow ("GE Healthcare", США). Люциферазу наносили на колонку, уравновешенную 20 mM TrisHCl pH 8,0, и хроматографировали в градиенте NaCl (0-0,5 M) в том же буфере.

2.10 Зависимость биолюминесценции гибридного белка от концентрации субстрата (целентеразина)

В лунки планшета для микротитрования добавили по 100 мкл растворов разных концентраций целентеразина в PBS (5,9 nM, 11,7 nM, 23,4 nM, 46,9 nM, 93,8 nM, 187,5 nM, 375 nM, 750 nM, 1500 nM, 3000 nM, 6000 nM) и 100 мкл PBS

(контрольный образец). Кинетику измеряли сразу после быстрого впрыска свежеприготовленного раствора целевого белка 14D5a-NanoLuc (50 мкл на лунку, 10 нМ, в PBS) с помощью планшетного люминометра LB 940 Multimode Reader Mithras (Berthold, Германия). Сигналы из соответствующих контрольных лунок принимали за фон и вычитали при построении кривой доза-ответ. Все измерения были выполнены в трех повторностях.

2.11 Предел обнаружения целевого белка

В лунки для микротитрования добавили по 100 мкл растворов разных концентраций гибридного белка в PBS+0,1% БСА ($1,69 \times 10^{-5}$ нМ, 5×10^{-5} нМ, $1,5 \times 10^{-4}$ нМ, $4,5 \times 10^{-4}$ нМ, $1,4 \times 10^{-3}$ нМ, $4,1 \times 10^{-3}$ нМ, $1,2 \times 10^{-2}$ нМ, $3,6 \times 10^{-2}$ нМ, 0,11 нМ, 0,33 нМ, 1 нМ) и 100 мкл PBS+0,1% БСА (контрольный образец). Биолюминесценцию измеряли сразу после быстрого впрыска свежеприготовленного раствора целентеразина (70 мкл на лунку, 10^{-7} нМ, в PBS) с помощью планшетного люминометра LB 940 Multimode Reader Mithras (Berthold, Германия). Сигналы из соответствующих контрольных лунок принимали за фон и вычитали при построении кривой доза-ответ. Все измерения были выполнены в трех повторностях.

2.12 Сравнение удельной активности целевого гибридного белка и дикого NanoLuc

В лунки для микротитрования добавили по 100 мкл 1 нМ раствора гибридного белка 14D5a-NanoLuc в PBS+0,1% БСА, либо 100 мкл 1 нМ раствора NanoLuc в PBS+0,1% БСА. Контрольный образец - 100 мкл PBS+0,1% БСА.

Биолюминесценцию измеряли сразу после быстрого впрыска свежеприготовленного раствора целентеразина (70 мкл на лунку, 6 мкМ, в PBS) с помощью планшетного люминометра LB 940 Multimode Reader Mithras (Berthold, Германия). Все эксперименты были выполнены в четырех

повторностях.

2.13 Выделение и очистка домена D3 рекомбинантного гликопротеина E ВКЭ

Компетентные клетки *E. coli* Rosetta Gami 2 трансформировали плазмидной ДНК, содержащей домен D3 рекомбинантного гликопротеина E ВКЭ, как описано в пункте 2.5.

Для получения инокулята в пробирку, содержащую 5 мл LB-среды и 200 мг/мл ампициллина, добавили несколько колоний *E. coli* Rosetta Gami 2, содержащих плазмиду pFLAG-DE3, и инкубировали в термошейкере ночь при 220 об/мин, 37°C.

Условия культивирования клеток и выделения из них домена D3 рекомбинантного гликопротеина E ВКЭ аналогичны условиям, описанным в пунктах 2.6-2.7.

Домен D3 рекомбинантного гликопротеина E ВКЭ очищали с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии в условиях, описанных выше. Белок элюировали 0,125 М имидазола. Затем концентрировали фракции домена D3 центрифугированием при 6000g, 15 мин, 4°C, несколько раз с добавлением свежей порции PBS до конечной концентрации имидазола, равной 3-5 mM.

Электрофорез фракций, полученных в ходе выделения и очистки целевого белка проводили в 12,5% полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 0,1% SDS, по методу Лэммли [6] в буфере TGB (таблица 1) и с постоянной силой тока 15 mA.

2.14 Взаимодействие полученного гибридного белка с доменом D3 гликопротеина E ВКЭ

В лунки непрозрачного планшета для микротитрования вносили по 60 мкл растворов домена D3 гликопротеина E ВКЭ с различной концентрацией (4,1 нг/мл, 12,3 нг/мл, 37 нг/мл, 111,1 нг/мл, 333,3 нг/мл, 1000 нг/мл в PBS),

раствором домена D3 коммерческого гликопротеина E ВКЭ 60 мкл на лунку с теми же концентрациями и 60 мкл PBS (контрольный образец) в термошейкере 1 ч при 37°C, затем промывали. Незанятую поверхность лунок блокировали 150 мкл 0,1% БСА в PBS при тех же условиях. Затем в каждую лунку планшета добавили по 60 мкл раствора полученного гибрида 14D5a-NanoLuc (15,54 мкг/мл в PBS), инкубировали 1 ч при комнатной температуре, затем промыли. Билюминесценцию измеряли сразу после быстрого впрыска свежеприготовленного раствора целентеразина (70 мкл на лунку, $2,75 \times 10^{-9}$ М, в PBS) с помощью планшетного люминометра LB 940 Multimode Reader Mithras (Berthold, Германия). Сигналы от соответствующих контрольных лунок принимали за фон и вычитали при построении кривой доза-ответ. Все измерения были выполнены в двух повторностях.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Получение генетической конструкции с геном гибридного белка 14D5a-NanoLuc

3.2 Получение гибридного белка и люциферазы NanoLuc дикого типа

3.3 Зависимость биолюминесценции гибридного белка от концентрации субстрата (целентеразина)

3.4 Предел обнаружения целевого белка

3.5 Сравнение удельной активности целевого гибридного белка и дикого NanoLuc

3.6 Выделение домена D3 гликопротеина E ВКЭ

3.7 Взаимодействие полученного гибридного белка с доменом D3 гликопротеина E ВКЭ

Изъятые страницы 30-47 в связи с авторскими правами

4. ВЫВОДЫ

Дипломная работа посвящена получению и определению свойств гибридного белка 14D5a-NanoLuc. Исходя из поставленных задач, были получены следующие результаты:

1. Получена генетическая конструкция, кодирующая гибридный белок 14D5a-NanoLuc и рекомбинантные клетки *E. coli* Rosetta Gami 2, несущие плазмиду pFLAG-14D5a-NanoLuc.
2. Целевой гибридный белок выделен из биомассы рекомбинантных клеток и очищен с помощью металл-аффинной хроматографии. По данным гель-электрофореза чистота белка составила 95,4%.
3. Исследованы биолюминесцентные свойства гибридного белка в сравнении с таковыми рекомбинантной люциферазы NanoLuc дикого типа. Установлены кинетические параметры реакции целевого гибридного белка с субстратом - целентеразином: $K_m = 0,347 \mu\text{M}$; $V_{\max} = 1,9 \cdot 10^5 \text{ о.с.е.} \cdot \text{с}^{-1}$; $k_{\text{cat}} = 1,9 \cdot 10^5 \text{ с}^{-1}$; $k_{\text{cat}}/K_m = 5 \cdot 10^5 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Эффективность биолюминесцентной реакции гибридного белка ниже таковой NanoLuc дикого типа на порядок ($k_{\text{cat}}/K_m = 7,9 \cdot 10^6 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$).
4. Исследована способность полученного белка связывать гликопротеин E ВКЭ. Установлена зависимость биолюминесцентного сигнала от концентрации гликопротеина E в диапазоне концентраций от 50 до 1000 нг/мл.

Таким образом, полученный нами гибридный белок обладает двумя функциями – биолюминесцентной активностью домена люциферазы NanoLuc и способностью миниантитела 14D5a связывать гликопротеин E вируса клещевого энцефалита – и может быть использован как специфичный репортер для выявления этого вируса.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- apo-Php – апофотопротеин
- СТМ – целентерамид
- СТЗ – целентеразин
- Luc – люцифераза
- PBS – фосфатно-солевой буфер
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- Буфер TGB – трис-глициновый буфер
- ВКЭ – вирус клещевого энцефалита
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИПТГ – изопропил- β -D-тиогалактопиранозид
- ИФА – иммуноферментный анализ
- КЭ – клещевой энцефалит
- o.s.e – относительные световые единицы
- ОП₆₀₀ – оптическая плотность при длине волны 600 нм
- ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
- ПААГ – полиакриламидный гель
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- СО РАН – Сибирское отделение Российской академии наук
- ЦНС – центральная нервная система
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

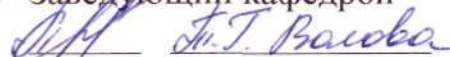
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Riss T. L. NanoLuc[®]: A Smaller, Brighter, and More Versatile Luciferase Reporter. – 2010.
2. Burakova L. P. et al. Bioluminescent detection probe for tick-borne encephalitis virus immunoassay //Analytical and bioanalytical chemistry. – 2015. – Т. 407. – №. 18. – С. 5417-5423.
3. Литусов Н. В. Вирус клещевого энцефалита: иллюстрированное учебное пособие. – 2017.
4. Франк Л. А. ЦЕЛЕНТЕРАЗИН-ЗАВИСИМЫЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ //Биофизика для экологии и медицины: К 90-летию академика РАН ИИ Гительсона. – 2019. – С. 72-87.
5. Frank, L.A. Recombinant hybrid proteins as biospecific reporters for bioluminescent microassay. Журнал СФУ. Биология. 2018, 11, 166-173.
6. Laemli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4 // Nature – 1970, № 227, P. 680–685.
7. Fleiss A., Sarkisyan K. S. A brief review of bioluminescent systems (2019) //Current genetics. – 2019. – Т. 65. – №. 4. – С. 877-882.
8. Mansfield K. L. et al. Tick-borne encephalitis virus—a review of an emerging zoonosis //Journal of General Virology. – 2009. – Т. 90. – №. 8. – С. 1781-1794.
9. Gritsun T. S., Lashkevich V. A., Gould E. A. Tick-borne encephalitis //Antiviral research. – 2003. – Т. 57. – №. 1-2. – С. 129-146.
10. Bogovic P., Lotric-Furlan S., Strle F. What tick-borne encephalitis may look like: clinical signs and symptoms //Travel medicine and infectious disease. – 2010. – Т. 8. – №. 4. – С. 246-250.
11. Frank L.A., Bashmakova E.E., Krasitskaya V.V., Kudryavtsev A.N. Genetically modified coelenterazine-dependent luciferases as reporters for in vitro assay // J. of Siberian Federal Univ. Biology. 2017. V. 10 (2). P. 199–210.

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой






подпись инициалы, фамилия

« 24 » июня 2022 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Получение и изучение свойств гибридного белка миниантитела 14D5a-
целентеразин-зависимая люцифераза NanoLuc

Научный руководитель	 подпись, дата	16.06.22 проф., д.б.н. должность, ученая степень	<u>Л.А.Франк</u> инициалы, фамилия
Выпускник	 подпись, дата	16.06.22 дата	<u>Э.Е.Бауэр</u> инициалы, фамилия
Консультант	 подпись, дата	16.06.22 к.б.н. должность, ученая степень	<u>Е.Е.Башмакова</u> инициалы, фамилия

Красноярск 2022