

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

Т.Г. Волова

подпись

инициалы, фамилия

« _____ » _____ 2024 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 — Биология

Целентеразин-зависимые люциферазы как потенциальные BRET-партнеры
красного флуоресцентного белка LSSmScarlet для аналитических приложений

Руководитель

подпись, дата

В. Н. с., канд.биол.наук

должность, учёная степень

С.В. Маркова

инициалы, фамилия

Выпускник

подпись, дата

П.А. Бочарова

инициалы, фамилия

Красноярск 2024

РЕФЕРАТ

Бакалаврская работа по теме «Целентеразин-зависимые люциферазы как потенциальные BRET-партнеры красного флуоресцентного белка LSSmScarlet для аналитических приложений» содержит 41 страницу текстового документа, 19 иллюстраций, 3 таблицы, 36 источников использованной литературы.

КРАСНЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БЕЛОК LSSMSCARLET, ЛЮЦИФЕРАЗА, BRET, БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ, АНАЛИТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ.

Целью работы было получение вариантов гибридных белков люцифераз *Metridia longa* и *Renilla muelleri* с красными флуоресцентным белком LSSmScarlet для оценки потенциала люцифераз как BRET-партнеров для детекции белок-белковых взаимодействий и получения «красного» репортера для биоимиджинга.

В ходе работы были получены две генно-инженерных конструкции гибридов люцифераз с красным флуоресцентным белком LSSmScarlet: конструкция с люциферазой *Metridia longa* и конструкция с люциферазой *Renilla muelleri*, которые экспрессировались в бактериальных клетках *E.coli* штамма XL1-Blue. Получен белковый препарат гибридного белка высокой степени очистки с помощью ионообменной и эксклюзионной хроматографий.

Спектрофотометрически проведена оценка переизлучения в полученных парах. Показано, что эффективность BRET в паре LSSmScarlet-RmL7 составляла порядка 40%. В паре LSSmScarlet-ML7-H7 переизлучение незначительно.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1. BRET — биоломинесцентный резонансный перенос энергии	6
1.2. Параметры эффективности BRET	7
1.3. Основные известные BRET-пары	9
1.4. Использование BRET для аналитики	10
1.5. Основные свойства красного флуоресцентного белка LSSmScarlet.....	11
1.6. Целентеразин-зависимые люциферазы <i>Metridia longa</i> и <i>Renilla mulleri</i> , их возможности использования в качестве BRET-партнёров.....	13
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	15
2.1. Материалы.....	15
2.2. Методы.....	17
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	24
3.1. Подбор оптимального красного флуоресцентного белка	24
ВЫВОДЫ	35
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	36
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	37

ВВЕДЕНИЕ

Резонансный перенос энергии Фёрстера (Förster resonance energy transfer (FRET)) обладает огромным потенциалом для визуализации и изучения межбелковых взаимодействий, рецепторов клеточной поверхности и активности ферментов. Обычно называемый молекулярной линейкой из-за его высокой зависимости от расстояния и ориентации, FRET позволяет проводить чувствительный анализ небольших пространственных изменений белков и используется для исследования межбелковых взаимодействий и конформационных изменений [1,2, 22].

Визуализация *in vivo* с использованием биолюминесцентных белков является неинвазивным и нетоксичным методом мониторинга процессов в клетках и моделях мелких животных [10, 14, 28, 31], который характеризуется высокой чувствительностью благодаря высокому соотношению сигнала к фону и может быть легко адаптирован к высокопроизводительному формату анализа.

Биолюминесцентный резонансный перенос энергии между донором-люциферазой и акцептором-флуоресцентным белком разделяет весь формализм FRET, но отличается тем, что возбуждение донора осуществляется биохимическим путем, а не внешним освещением [6, 7, 32].

Эффективность BRET в значительной степени зависит от спектрального перекрытия излучения донора и поглощения акцептора, расстояния донор-акцептор и их относительной ориентации [6, 33]. Таким образом, выбор подходящих пар и конструкция линкера, соединяющего эти молекулы, являются очень важными вопросами, которые необходимо учитывать при разработке репортеров BRET.

Активное использование биолюминесцентных белков, люцифераз и фотопротеинов, в качестве аналитических систем обусловлена их привлекательными свойствами, такими как ферментативная реакция, независимая от наличия кофактора, высокая биолюминесцентная активность, низкий предел обнаружения и широкий линейный диапазон измерений. Однако

наиболее популярным является применение их в качестве генетически кодируемых секретируемых репортеров для неразрушающих анализов экспрессии репортерных генов различных видов, мониторинга роста опухоли, включая рост опухолевых масс в недоступных местах, метастазирование, определение реакция на лечение, перенос генов, активация факторов транскрипции и прочее [28].

В рамках бакалаврской работы поставлена цель получить варианты гибридных белков люцифераз *Metridia* и *Renilla* с красным флуоресцентным белком LSSmScarlet и оценить их потенциал как BRET-репортеров для детекции белок-белковых взаимодействий и получения «красного» репортера для биоимиджинга.

Задачи:

1. Спроектировать и получить генно-инженерные конструкции для синтеза гибридных белков.
2. Оценить экспрессию полученных конструкций.
3. Очистить гибридные белки.
4. Охарактеризовать переизлучение в полученных BRET-парах.

Вся работа проведена на базе лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН, г. Красноярск.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. BRET — биоломинесцентный резонансный перенос энергии

Биоломинесценция – процесс ферментативного окисления субстратов-люциферинов ферментами – люциферазами (рис. 1). В результате, при возвращении продукта окисления из возбуждённого состояния в основное, происходит излучение видимого света [17].

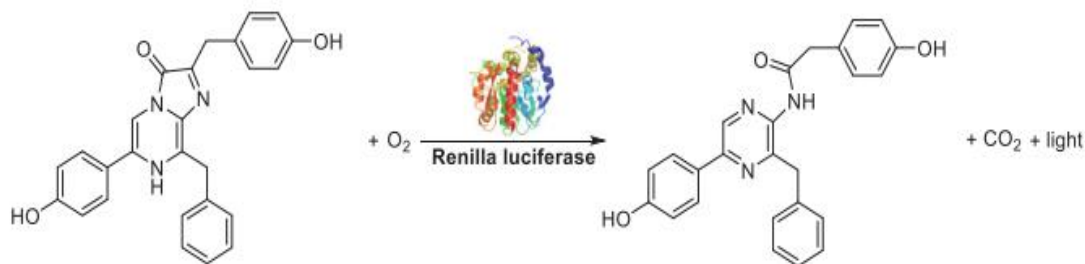


Рисунок 1. Схема реакции биоломинесценции на примере RLuc [29]

Резонансный перенос энергии биоломинесценции (Bioluminescence resonance energy transfer (BRET)) — это безызлучательная передача энергии от донора биоломинесцентного белка к акцептору флуорофора. Акцептором обычно является флуоресцентный белок (флуорофор), который поглощает свет с заданной длиной волны и повторно излучает свет с большей длиной волны.

Резонансный перенос энергии Фёрстера (FRET) описывает перенос энергии между двумя хромофорами. Молекула-донор, находясь в электронном возбуждённом состоянии, при освещении светом определённой длины волны, может передать энергию молекуле-акцептору посредством диполь-дипольной связи. То есть, перенос энергии не включает излучение и повторное поглощение фотона, а является результатом дальнедействующей связи между переходными диполями двух участвующих хромофоров [7, 19]. Эффективность передачи энергии зависит от расстояния между донором и акцептором (1-10 нм), что делает FRET чувствительным методом измерения расстояний между молекулами.

BRET разделяет весь формализм резонансной передачи энергии Фёрстера (FRET), но отличается одним ключевым аспектом: возбуждение донора осуществляется биохимическим путем, а не внешним освещением [6].

Явление BRET происходит между двумя проксимально расположенными хромофорами – люциферазой, являющейся биолюминесцентным донором, и флуоресцентным белком – акцептором, с перекрывающимися спектрами излучения донора и возбуждения акцептора. При добавлении субстрата часть энергии электронного возбуждения донора рассеивается из-за случайных столкновений с другими молекулами, одновременно с этим оставшаяся энергия электронной релаксации передается молекуле-акцептору посредством безызлучательной энергии диполь–дипольных связей. При возбуждении молекула-акцептор излучает свою фотонную энергию на своей характерной длине волны. Это приводит к уменьшению эмиссии фотонов донора параллельно с увеличением эмиссии акцептора.

1.2. Параметры эффективности BRET

Теория, описывающая процесс резонансного переноса энергии, наиболее полным образом разработана для резонансного переноса энергии флуоресценции. Тем не менее, основные её положения применимы и для других люминесцентных, в том числе хеми- и биолюминесцентных хромофоров.

Как и в случае с FRET, скорость передачи энергии в BRET также имеет обратную зависимость от расстояния в шестой степени [1, 3]. Помимо расстояния между молекулами донора и акцептора, на эффективность передачи энергии также влияют спектральное перекрытие между спектрами люминесценции донора и поглощения акцептора и взаимная ориентация соответствующих диполей. Несмотря на сходство, BRET имеет некоторые особые преимущества по сравнению с FRET.

Например, во FRET при возбуждении донора внешним освещением, молекулы, отличные от целевых флуорофоров, в изобилии присутствующих в

биологическом образце, также могут возбуждаться и слабо флуоресцировать, что приведёт к неверному соотношению сигнал/шум и, впоследствии, к неверным данным эксперимента. Более того, лазерный луч, обычно используемый в исследованиях FRET, может привести к повреждению структуры молекулы флуорофора, что делает её неспособной к дальнейшему флуоресцированию, если требуется второй раунд возбуждения [4]. При использовании BRET данные проблемы не возникают, так как нет необходимости во внешнем освещении, ведь биолюминесцентная реакция запускается добавлением субстрата. Это важно для оценки макромолекулярных взаимодействий и разработки новых классов биосенсоров, зондов, противораковых средств и даже светосборных и направляющих наноустройств.

Строгая зависимость BRET от оптимального расстояния в 1-10 нм делает его подходящим методом для изучения белок-белковых взаимодействий [35]. Так как средний радиус белка составляет примерно 5-15 нм, то это означает, что положительный сигнал BRET будет задетектирован только в случае нахождения двух белков на расстоянии около 10 нм друг от друга, что является показателем прямого взаимодействия между двумя белками. Однако отсутствие сигнала BRET не обязательно означает, что два белка не взаимодействуют друг с другом. Отсутствие сигнала может быть объяснено неблагоприятной ориентацией между донором и акцептором (рис. 2).

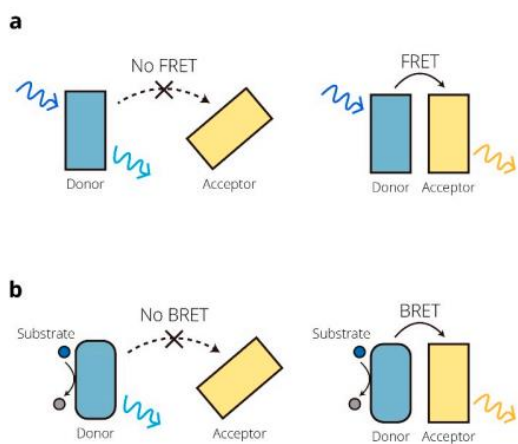


Рисунок 2. Схема зависимости FRET (a) и BRET (b) от ориентации акцептора [10]

1.3. Основные известные BRET-пары

Биосенсоры позволяют анализировать смеси сложного состава на предмет присутствия определённого вещества, а высокая чувствительность помогает в обнаружении веществ при очень низкой их концентрации. В последние годы появилось множество биосенсоров на основе FRET и BRET, используемых во многих областях, таких как диагностика заболеваний, визуализация *in vivo*, обнаружение загрязняющих веществ и патогенов [21].

Пары люцифераза-флуоресцентный белок являются популярным выбором для систем BRET, причем первые коммерчески доступные системы BRET (BRET1 и BRET2) используют акцепторы на основе флуоресцентного белка (FP) [23]. На сегодняшний день, несмотря на превосходные биолюминесцентные свойства, продемонстрированные люциферазами копепод, существует лишь несколько примеров конструирования репортеров BRET с использованием этих люцифераз в качестве донора. Одним из них является датчик BRET на основе GrLuc, слитый с белком повышенной желтой флуоресценции через специфичный для энтерокиназы сайт расщепления в качестве линкера для определения энтерокиназной активности. Хотя коэффициент BRET составлял всего около 0,47, изменение соотношения желтого и синего пиков позволило количественно определить энтерокиназу *in vitro* с пределом обнаружения около 23 часов. Замена eYFP в этом сенсоре на красный флуоресцентный белок tdTomato привела к снижению коэффициента BRET до 0,23. Эти химерные конструкции, называемые люминопсинами, использовались для модуляции активности нейронов. Этот новый подход в области оптогенетики способствовал изучению функциональных характеристик культур нейронных клеток и нейродегенеративных заболеваний у модельных лабораторных животных *in vivo*.

Также были разработаны новые поколения BRET, в которых донор, акцептор и субстрат в биолюминесцентной реакции варьируются в зависимости от системы для достижения лучшего эффекта (рис. 3).

Table 1. Classic CTZ-consuming luciferase BRET systems.

System	Donor	Acceptor	Substrate	Features	Ref
BRET1	Rluc/Rluc8	EYFP	Coelenterazine-h DeepBlueC		[39]
BRET2	Rluc	GFP2/GFP10	(bisdeoxycoelenterazine, coelenterazine 400a, di-dehydro coelenterazine)	Enlarged separation of donor and acceptor emission spectra, higher signal resolution	[40,41]
BRET3	Rluc8	mOrange	Coelenterazine-h	Longer wavelengths of the emission light and weaker attenuation of biological tissue	[41,45]
eBRET	Rluc	eYFP	EnduRen	Prolonged detection timescale from minutes to hours, enhanced luminescence intensity	[42–44]
BRET3.1	Rluc8	mOrange	Coelenterazine-v		[46]
BRET4	Rluc8	TagRFP	Coelenterazine-h		[47]
BRET4.1	Rluc8	TagRFP	Coelenterazine-v		[46]
BRET5	Rluc8.6	TagRFP	Coelenterazine-h		[46]
BRET6	Rluc8.6	TurboFP635	Coelenterazine-h		[46]
BRET6.1	Rluc8.6	TurboFP636	Coelenterazine-v		[46]
BRET7	Rluc8	TurboFP637	Coelenterazine-v		[47]
BRET8	Rluc8.6	TurboFP638	Coelenterazine-h		[47]
BRET9	ALuc23	FP, such as mCherry	Coelenterazine	A conceptually unique ligand-activatable BRET system	[48]

Рисунок 3. Самые распространённые BRET-пары [32]

1.4. Использование BRET для аналитики

Биолюминесценция (BL), то есть излучение света живыми организмами, появляется в качестве подходящей альтернативы более распространённой флуоресценции. Способность испускать фотоны без необходимости фотовозбуждения делает BL весьма привлекательным для внедрения в портативные и миниатюрные устройства [25]. BL предоставила мощную многоуровневую систему, основанную на различных люциферазах и аналогах люциферинов, с широким спектром применений от молекулярной визуализации до разработки биосенсоров [8, 12, 14].

Репортеры BRET основаны на люциферазах, слитых с флуоресцентными белками демонстрируют излучение света со смещением в красный цвет, что может значительно улучшить оптическую визуализацию глубоких тканей *in vivo* благодаря лучшему проникновению света длинноволновой области спектра [20].

В последние годы появилось множество биосенсоров на основе FRET и BRET, используемых во многих областях, таких как диагностика заболеваний, визуализация *in vivo*, обнаружение загрязняющих веществ и патогенов. Кроме того, данные системы широко используются для фундаментальных

исследований биологических процессов, таких как сигнальные пути, метаболизм и поведение клеток, а также для обнаружения различных веществ, представляющих интерес в организмах, как качественно, так и количественно. Биомаркеры, такие как малые молекулы, нуклеиновые кислоты, ферменты, белки, антигены, гормоны, метаболиты, могут обеспечивать возможность точной и ранней диагностики заболеваний. Биосенсоры на основе FRET, особенно биосенсоры на основе BRET, в которых не требуется возбуждение внешним светом, были внедрены в ПОС-приложения [33].

Основной особенностью реакций биолюминесценции является высокая эффективность излучения, по сравнению с хемилюминесценцией. Это позволяет проводить сверхчувствительное обнаружение вплоть до аттомольного уровня в различных биоаналитических приложениях.

Существует несколько вариантов люциферазы с улучшенными эмиссионными свойствами, такими как более медленное затухание излучения, повышенная интенсивность и смещенная в красный цвет длина волны излучения. Они могут быть использованы для различных биоаналитических применений, даже в мультиплексированном формате.

1.5. Основные свойства красного флуоресцентного белка LSSmScarlet

Красные флуоресцентные белки с большим сдвигом Стокса представляют собой класс белков, имеющих разницу между пиками спектров возбуждения и излучения флуоресценции более 100 нм. Благодаря данному эффекту данные белки могут эффективно возбуждаться синим или голубым светом, флуоресцируя при этом красным цветом.

Использование именно красных флуоресцентных белков для создания различных аналитических систем для прослеживания биохимических процессов, мониторинга эффективности применения различных препаратов в лечении обусловлено особенностью живых тканей пропускать только свет, находящийся в красной области спектра [9]. Это позволит проводить диагностику не только *in vitro*, но и *in vivo*.

LSSmScarlet имеет типичную β -бочкообразную складку с хромофором, расположенным на центральной спирали бочонка (рис. 4). Данный белок характеризуется большим сдвигом Стокса, составляющим 128 нм, что позволяет четко различить световые сигналы разного цвета. Возбуждение флуоресценции белка LSSmScarlet происходит при длине волны 488 нм, что соответствует сине-зелёной области спектра, а максимум испускания соответствует 598 нм, то есть оранжевому цвету [27, 36].

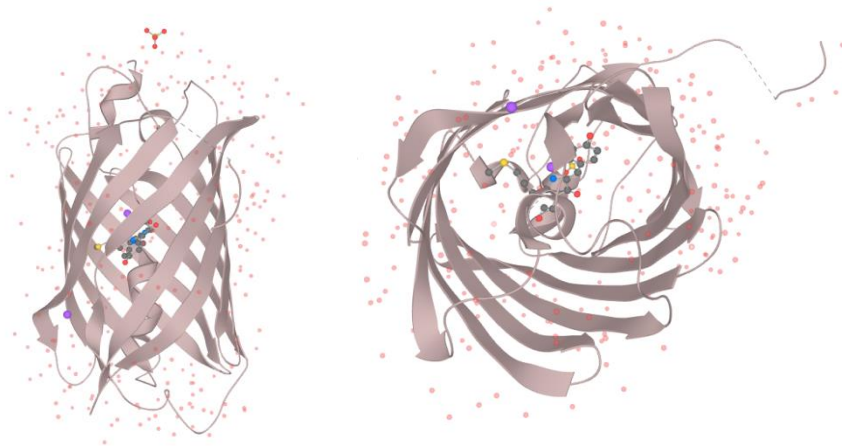


Рисунок 4. 3D структура белка LSSmScarlet [36]

Данный белок является мономером и подходит для маркировки отдельных белков и снижения цитотоксического эффекта [24]. Успешно применён при работе на живых клетках млекопитающих [27].

Также является одним из самых ярких красных флуоресцентных белков наряду с dCyOFP2s > dCyRFP2s > LSSmScarlet > CRISPRed2s [26].

Квантовый выход 0,42 означает, что 42% поглощенных фотонов приводит к испусканию фотонов в ходе флуоресценции. Яркость свечения составляет 12,68. Яркость зависит от рКа – рН, при которой интенсивность флуоресценции падает до 50% от максимальной. Для LSSmScarlet рКа составляет 5,8. Скорость созревания составляет 61 минуту [36].

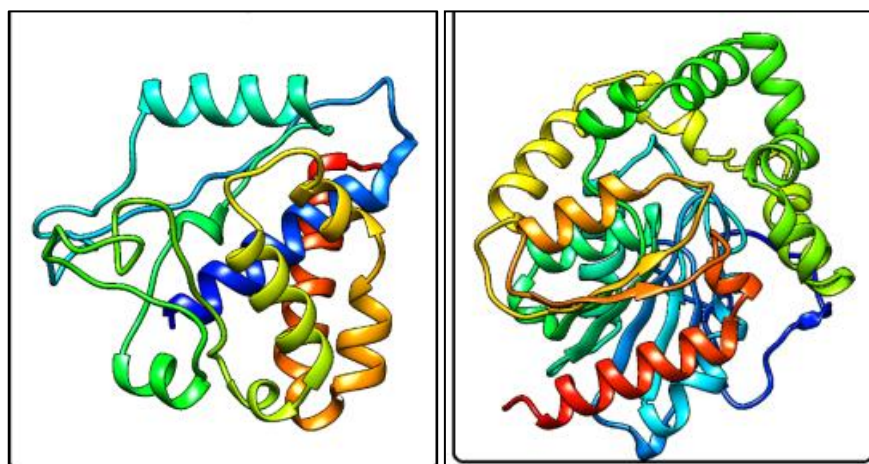
Исходя из вышеперечисленных характеристик, таких как: большой стоксов сдвиг 128 нм, флуоресценция в красной области спектра, мономерность, высокая яркость при свечении, можно ожидать, что красный

флуоресцентный белок LSSmScarlet является подходящим объектом для исследований.

1.6. Целентеразин-зависимые люциферазы *Metridia longa* и *Renilla mulleri*, их возможности использования в качестве BRET-партнёров.

Системы целентеразин-люциферазы типичны для морских организмов, где молекула люциферина окисляется O_2 под действием люциферазного катализа, образуя в качестве продукта целентерамид [11, 17]. Большинство из этих систем содержат естественный сигнальный пептид для секреции, который позволяет проводить измерения уровня BL непосредственно в среде, без необходимости лизирования клеток или тканей.

Люциферазы *Metridia longa* (рис. 5А) и *Renilla mulleri* (рис. 5Б) не нуждаются в кофакторах для запуска процесса излучения света, что является их преимуществом, по сравнению с люциферазами светлячков.



А.

Б.

Рисунок 5. 3D структуры, полученные компьютерным моделированием, люцифераз (А) *Metridia longa* и (Б) *Renilla muelleri* [5]

Люцифераза *Metridia longa* – фермент, катализирующий реакцию биолюминесценции, который был выделен из одноименного морского организма, относящегося к подклассу *Copepoda*.

Люцифераза *Renilla muelleri* – фермент, катализирующий реакцию биолюминесценции, который был выделен из мягкого коралла, относящегося к подклассу *Octocorallia* (*Anthozoa*, *Cnidaria* [2, 5, 11].

Данные люциферазы обладают высокой стабильностью, сравнительно небольшими размерами и хорошей биолюминесцентной активностью, что очень выгодно при использовании их в качестве репортёрных белков. Также важную роль играет их узкоспецифичность при использовании только целентеразин в качестве субстрата.

Выявлено, что люциферазы *Renilla* и *Metridia* способны независимо сворачиваться в нативную структуру. Это очень важно для снижения количества неудачных экспериментов из-за неправильной конформации фермента.

Люциферазы копепод имеют высокую термостабильность, что, вероятно, связано с наличием большого количества S-S связей, которые позволяют сохранять стабильность пространственной структуры [2].

Люцифераза *Renilla* имеет молекулярную массу 36 кДа. Изоформа MLuc7 из *Metridia longa* имеет молекулярный вес 16,5 кДа и является самой маленькой из всех известных природных люцифераз [15, 16]. Небольшой размер репортерного белка важен для снижения метаболической нагрузки на клетку-хозяина, сведения к минимуму структурных помех при использовании в конъюгатах и в виде слияний с другими белками, а также для лучшей передачи энергии в BRET-конструкциях.

Однако при использовании люцифераз в качестве репортерных белков следует учитывать значительное снижение активности при температуре в 37°C, что может препятствовать применению этих люцифераз в качестве репортеров для анализов *in vivo*.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

В работе по созданию генетических конструкций использовались следующие материалы:

- LSSmScarlet предоставлен Курчатовским институтом [33];
- вектор pQE-9 (NdeI-XhoI) из музея лаборатории фотобиологии СО РАН;
- клетки *E. coli*, штамма XL1-Blue;
- набор QIAquick Gel Extraction Kit для выделения ДНК из агарозного геля и реакционных смесей («QIAGEN», Германия);
- набор QIAprep Spin Miniprep Kit для выделения плазмидной ДНК («QIAGEN», Германия);
- набор QIAquick PCR Purification kit для очистки ПЦР-фрагментов («QIAGEN», Германия);
- Буфер для электрофореза – TAEх50;
- Легкоплавкая агароза («Bio-Rad»);
- Маркеры молекулярного веса «1 kb DNA Ladder» SibEnzyme и «100 bp Ladder» NEB;
- SDS-PAGE Standards, low range, Bio-Rad;
- SOC-среда: 2% бакотриптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10 мМ NaCl, 2,5 KCL, 10 мМ 2M MgCl₂, 10 мМ MgSO₄, глюкоза 20 мМ;
- LB-среда: 1% бакотриптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 130 мМ NaCl, 1,5% агар;
- Ампицилин;
- Праймеры, таблица 1;

Таблица 1 – Использованные праймеры

№	Последовательность (5'→3')
53	5'- AGTCTCGAGTTATTGTTTCATTTTTAAGAACACG-3'
752	5'-CTCTACAAATGTGGTATGGC-3'
996	5'-TAGTACATATGGTGAGCAAGGGCGAGGCA-3'

1002	5'-GTAGGTACCGTGAGCAAGGGCGAGGCA-3'
1003	5'-GTAGGATCCACGTCAAAAGTTTACGATCC-3'

- ИПТГ (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид) 100 мМ;
- Растворы для хроматографии:
 - A₁ (0.15 М NaCl, 20 mM imidazole, 20 mM Tris buffer pH 7.5, 5% glycerol);
 - A₂ (0.15 М NaCl, 50 mM imidazole, 20 mM Tris buffer pH 7.5, 5% glycerol);
 - A₃. (0.15 М NaCl, 250 mM imidazole, 20 mM Tris buffer pH 7.5, 5% glycerol).
- Растворы для белкового ДСН-электрофореза:
 - Трис-глициновый буфер: 1,92 М глицина, 0,25 М трис, 1% ДСН;
 - Лизирующий буфер для приготовления образцов: 45 мМ Трис-НСl pH 6,8; 2% ДСН, 50 мМ ДТТ, 5% β-меркаптоэтанол, 10% глицерин, ~0.25 % бромфеноловый синий;
 - Нативный буфер для нанесения образцов: 45 мМ Трис-НСl pH 7.0, 10% глицерин;
 - ОВ буфер: 20 мМ Трис-НСl pH 7.0, 1 мМ EDTA.

2.2. Методы

2.2.1. ПЦР синтез фрагментов

Фрагменты ДНК для генетических конструкций были синтезированы в ходе ПЦР с использованием Tersus ДНК-полимеразы (Евроген, Россия). Состав реакции на 1 образец:

- 40 мкл ddH₂O;
- 5 мкл x10 Tersus buff (Евроген);
- 1 мкл 10 mM dNTP;
- 1 мкл Tersus polymerase mix 2020 (Evrogen);

К общей ПЦР-смеси добавить:

- 1,5 мкл соответствующих 5'- и 3'- праймеров
- 1,5 мкл матрицы.

Параметры ПЦР:

- 95°C 1 мин
 - 94°C 20 сек
 - 51 °C 30 сек
 - 72°C 1 мин 40 сек
- } 17 циклов
- 72°C 4 мин
 - 4°C 30 мин,

где 94°C – температура денатурации матрицы, 51 °C – температура отжига праймеров, 72°C – реакция полимеризации.

2.2.2. Аналитический ДНК-электрофорез в 1% геле агарозы

Образцы ДНК разделяли в 1% агарозном геле с использованием буфера TAEх1 при рабочем напряжении 100 мВ. В гель и буфер добавляли интеркалирующий краситель – бромистый этидий (EtBr) до конечной концентрации 1 мкг/мл. На гель наносили также стандартные маркеры молекулярного веса 100bp DNA Ladder (NEB, США) и 1kb DNA Ladder (SibEnzyme, Россия) в объеме 2 мкл. Концентрацию ДНК в каждой из фракций

оценивали визуально по флуоресценции бромистого этидия в УФ свете. По расстоянию, пройденному фрагментом в геле, определяли его размер в сравнении с маркерами. Съёмку гелей проводили с использованием системы видеодокументации «AlfaImager HP System» (Protein Simple, США).

2.2.3. Очистка продуктов ПЦР

Очистку полученных фрагментов проводили по специальному протоколу с использованием реактивов из набора QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Германия).

Связывающий буфер PB добавляли в пятикратном объёме относительно объёма использованных фрагментов. Смесь перемешивали и затем переносили на колонку из набора с фильтром из силикагеля. Центрифугировали в течение одной минуты при 14000 об/мин. Проходящий через колонку раствор сливали.

Для промывки сорбированной ДНК на колонку наносили 500 мкл промывочного буфера PE. Инкубировали в течение трёх минут. Центрифугировали в течение одной минуты при 14000 об/мин. Проходящий через колонку раствор сливали.

Второй раз наносили промывочный буфер PE в объёме 250 мкл. Инкубировали в течение трёх минут. Центрифугировали в течение двух минут при 14000 об/мин. Проходящий через колонку раствор сливали.

Колонку с промытой ДНК переносили в чистую 1,5 мл пробирку. Оставляли на 15 мин для окончательного испарения спирта.

В центр фильтра с ДНК добавляли 50 мкл элюирующего буфера EB с 1мМ EDTA. Инкубировали в течение трёх минут. Центрифугировали в течение двух минут при 14000 об/мин. Выделенную ДНК хранили при -20°C.

2.2.4. Рестрикция

Была приготовлена рестрикционная смесь, следующего состава:

- 26 мкл очищенной ДНК;
- 4 мкл оптимального буфера;
- 0,8 мкл буфера BSAx50;

- 1,5 мкл специфической эндонуклеазы №1 (S/E, 20 U/мкл)
- 1,5 мкл специфической эндонуклеазы №2 (S/E, 20 U/мкл).

Смесь инкубировали 2 часа при 37°C.

После рестрикции фрагменты разделяли методом препаративного электрофореза.

2.2.5. Препаративный ДНК-электрофорез в 1% агарозном геле

Электрофорез проводили в 1% агарозном геле без добавления бромистого этидия и в буфере TAEх1 также без добавления бромистого этидия. Лунка была сделана почти на всю ширину геля. В неё наносили рестрикционную смесь, предварительно смешанную с буфером и бромфиолетовым синим. Разделение проводили при рабочем напряжении в 40 В.

2.2.6. Выделение целевой ДНК из агарозного геля

После завершения препаративного электрофореза по краям геля бритвой, захватив края лунок, были вырезаны полосы, которые затем поместили подложку с дистиллированной водой с добавлением 5 мкл бромистого этидия. После 15 минут выдержки полоски помещались под ультрафиолет. Насечками было отмечено местоположение нужного фрагмента. Вернув полоски к основному гелю, по месту насечек был вырезан участок с ДНК.

Выделение ДНК из геля проводили с использованием набора QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Германия). С помощью электронных весов была определена масса геля, к которой был добавлен двукратный объём буфера QG. Инкубация проводилась с периодическим встряхиванием пробирки до полного растворения геля.

Затем добавили однократный объём изопропанола. Полученную смесь переносили на колонку и центрифугировали 1 мин при 14000 об/мин. Супернатант сливали.

Наносили 500 мкл буфера QG и снова центрифугировали 1 мин при 14000 об/мин. Супернатант сливали.

Наносили 500 мкл PE буфера и инкубировали 5 мин. Снова центрифугировали 1 мин при 14000 об/мин. Супернатант сливали.

Второй раз наносили промывочный буфер PE в объёме 250 мкл. Инкубировали в течение трёх минут. Центрифугировали в течение двух минут при 14000 об/мин. Проходящий через колонку раствор сливали.

Колонку с промытой ДНК переносили в чистую 1,5 мл пробирку. Оставляли на 15 мин для окончательного испарения спирта.

В центр фильтра с ДНК добавляли 30 мкл элюирующего буфера EB. Инкубировали в течение трёх минут. Центрифугировали в течение двух минут при 14000 об/мин. Выделенную ДНК хранили при -20°C.

2.2.7. Трансформация

Для трансформации использовали 100 мкл компетентных клеток *E. coli* штамма XL1-Blue, к которым добавляли 3 мкл плазмиды. Инкубировали на льду 30 мин. Далее проводили «heat-shock» помещением пробирки с клетками и плазмидой в водяную баню 42°C на 45 секунд. После этого сразу же помещали клетки в лёд. К клеточной суспензии добавляли пятикратный объём SOC-среды и инкубировали в течение 1 часа при 37°C.

После инкубирования клетки высевали на чашки Петри с LB-средой и 50 мкл ампицилина. Помещали чашки в термостат на ночь при 37°C.

2.2.8. Быстрый скрининг

Для анализа рекомбинантных колоний на наличие вставки применяли метод быстрого ПЦР-скрининга колоний.

Была приготовлена ПЦР-смесь в расчёте 20 мкл на образец:

- 15,4 мкл H₂O;
- 2 мкл x10 Taq buff;
- 0,8 мкл 10 mM dNTP;
- 0,7 мкл 10 мкМ 5'-праймера;
- 0,7 мкл 10 мкМ 3'-праймера;

- 0,4 мкл Taq polymerase (5U/мкл).

Следующим шагом перенесли часть колонии с агара в пробирку и поставили ПЦР реакцию.

Параметры ПЦР:

- 95°C 2 мин
 - 95°C 20 сек
 - 57°C 30 сек
 - 72°C 1 мин 40 сек
 - 72°C 5 мин
 - 4°C 30 мин,
- } 15 циклов

где 95°C – температура денатурации матрицы, 57°C – температура отжига праймеров, 72°C – реакция полимеризации.

После первого цикла останавливали реакцию на 72°C и перемешивали содержимое пробирок на вортексе, затем продолжали ПЦР.

2.2.9. Сборка генетических конструкций

Для сшивания вектора с фрагментами использовали 1 мкл ДНК-лигазы (S/E, 200 U/мкл). Реакцию проводили в лигазном буфере T4-LigBufx10 (S/E, 2021) в течение ночи при 16°C.

2.2.10. Выделение плазмидной ДНК набором QIAprep Spin Miniprep Kit («QIAGEN»)

Клетки выращивали в 6 мл жидкой LB-среды с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) при 37°C в течение ночи. Затем биомассу центрифугировали 2 мин при 6000 об/мин, супернатан сливали.

Осадок ресуспендировали в 500 мкл раствора P1 (с РНКазой), добавляли 500 мкл раствора P2 (Lysis solution) и 750 мкл раствора N3 (Нейтрализующий раствор), затем центрифугировали 10 мин при 14000 об/мин. Супернатант переносили на колонку, центрифугировали в течении 1 минуты на 14000 об/мин, проходящий сквозь колонку раствор сливали. Далее колонку последовательно промывали буферами PB (500 мкл) и PE (500 и 250 мкл),

каждый раз сливая жидкость после центрифугирования, после чего колонку сушили 10 мин. ДНК элюировали добавлением 80 мкл буфера EB + 1mM EDTA с последующим центрифугированием (2 мин, 14000 об/мин). Выделенную ДНК хранили при -20°C.

2.2.11. Ионообменная хроматография на колонке His-Trap Ni²⁺

На предварительно уравновешенную колонку растворами A3 и A1 проводили осаждение белка с использованием раствора A1. Растворами A2 и A3 проводили смыв белка с колонки. Собирали фракции в пробирки. Далее было добавлено 50 мкл TEV-протеаз (при работе с RmL7) и проведена инкубация при 4°C в течение ночи. Затем повторяли ионообменную хроматографию. Собирали первую фракцию.

2.2.12. Приготовление образцов для белкового ДСН-ПААГ-электрофореза

Для приготовления образцов растворимой и нерастворимой частей клеток к осажденным из 500 мкл культуры клеткам добавляли буфер ОВ с учетом клеточной плотности (на 1 оптическую единицу добавляли 100 мкл буфера). Клетки разрушали с использованием ультразвука в три раунда по 6 секунд, перерыв между разрушением клеток составлял 1 минуту. Все манипуляции проводились во льду. После центрифугирования разрушенных клеток супернатант отбирали и смешивали в пропорции 1:1 с двукратным лизирующим буфером, оставшийся осадок растворяли в том же объеме лизирующего буфера. Для приготовления образцов целых клеток к осажденным клеткам из 500 мкл культуры добавляли лизирующий буфер с учетом клеточной плотности (на 1 оптическую единицу добавляли 100 мкл буфера). Образцы кипятили в течение 3-х минут перед нанесением на гель.

2.2.13. Полунативный ДСН-ПААГ-электрофорез

Оценку уровня экспрессии целевых белков в клетках *E.coli* штамма XL1-Blue проводили электрофорезом в 12,5% полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия методом Лэммли при использовании

камеры (PerkinElmer, США) в трис-глициновый буфере с постоянной подачей тока 10 мА..

Заливали гель-пробку состава – 500 мкл акриламида, 5 мкл TEMED, 10 мкл PSA. Наносили гель в камеру снизу и ждали полного застывания.

Разделяющий гель состава – 769 мкл деионизованной воды, 1407 мкл раствора Tris-HCl 1M pH 9.0, 1500 мкл акриламида, 37,5 мкл SDS, 7,5 мкл TEMED, 15 мкл PSA – наносили в камеру и заливали деионизованной водой, ждали раздела фаз «вода-гель».

Концентрирующий гель состава – 500 мкл деионизованной воды, 250 мкл раствора Tris-HCl 0,5M pH 6.8, 150 мкл акриламида, 20 мкл SDS, 5 мкл TEMED, 10 мкл PSA – заливали в камеру, вставляли гребёнку.

Денатурированные образцы готовили с использованием лизирующего буфера как в п. 2.2.12 и кипятили в течение 3 мин. При проведении электрофореза в полунативных условиях образцы готовили в нативном буфере без ДТТ и β-меркаптоэтанола и не кипятили. Электрофорез проводили с охлаждением камеры подведённой холодной водой при постоянной силе тока равной 0,01А.

2.2.14. Регистрация изображений

Для окрашивания гелей использовали раствор (20% уксусной кислоты, 50% этанола, Coomassie R-250 (Bio-Rad, США)) с последующей промывкой. В случае с окрашиванием гистидин-содержащих белков предварительно фиксировали гель в растворе с 10% уксусной кислотой и 50% этанолом в течение 20 мин, отмывали водой в течение 10 мин и заливали раствором флуоресцентного красителя «InVision» (Invitrogen, США). Съёмку гелей при естественном освещении или в ультрафиолетовом свете осуществляли в камере AlphaImager (AlphaInnotech, США). Съёмку полунативных гелей для регистрации флуоресцирующих белков проводили с использованием трансиллюминатора SafeImager Blue-Light Transilluminator (Invitrogen, 470 нм) немедленно после электрофореза после снятия верхнего стекла, иглой отмечали положение флуоресцентных полос.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Подбор оптимального красного флуоресцентного белка

Страницы 24-34 изъяты в связи с авторским правом.

ВЫВОДЫ

1. Получено 2 генно-инженерных конструкции гибридов люцифераз с красным флуоресцентным белком LSSmScarlet: конструкция с люциферазой *Metridia longa* и конструкция с люциферазой *Renilla muelleri*.
2. Конструкции pQE9-LSSmScarlet-br7-ML7-His7 и pQE7-His6-LSSmScarlet-br6-RmL7 были экспрессированы в клетках *E.coli* штамма XL1-Blue.
3. Получены белковые препараты высокой степени очистки.
4. Охарактеризованы переизлучения в полученных BRET-парах. В паре LSSmScarlet-RmL7 переизлучение составило порядка 40%. В паре LSSmScarlet-ML7-H7 переизлучение незначительно.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BL – bioluminescence;

bp – пара нуклеотидных оснований;

BRET – Bioluminescence resonance energy transfer (биолюминесцентный резонансный перенос энергии);

dNTP – дезоксинуклеотидтрифосфат;

FRET – Förster resonance energy transfer (резонансный перенос энергии Фёрстера);

kb – тысяча пар нуклеотидов;

M – концентрация, моль/литр;

MLuc – люцифераза копепод *Metridia longa*;

RmL – люцифераза коралла *Renilla muelleri*;

мкл – микролитр, 10^{-6} л;

мл – миллилитр, 10^{-3} л;

об/мин – скорость, обороты в минуту;

ПЦР – полимеразная цепная реакция.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Гороховатский, А. Ю. Исследование резонансного переноса энергии биолюминесценции в гибридных белках и их комплексах : специальность 02 00. 10 «Биоорганическая химия" : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук / Гороховатский Андрей Юрьевич ; Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. – Пушино, 2005. – 24 с.
2. Еремеева Е. В., Маркова С. В., Высоцкий Е. С. ВЫСОКОАКТИВНЫЙ BRET-РЕПОРТЁР НА ОСНОВЕ" ЖЕЛТОГО" МУТАНТА ЛЮЦИФЕРАЗЫ RENILLA MUELLERI //Доклады Академии наук. – Федеральное государственное бюджетное учреждение" Российская академия наук", 2013. – Т. 450. – №. 4. – С. 474-474.
3. Шрамова Е. И., Деев С. М., Прошкина Г. М. Эффективность биолюминесцентного резонансного переноса энергии в системе NanoLuc-miniSOG–фуримазин //Биоорганическая химия. – 2018. – Т. 44. – №. 6. – С. 664-668. DOI : <https://doi.org/10.1134/S0132342318060106>
4. Шрамова, Е. И. Индукция фототоксичности флавопротеида miniSOG посредством биолюминесцентного резонансного переноса энергии / Е. И. Шрамова, Г. М. Прошкина, С. П. Чумаков, Ю. М. Ходарович, С. М. Деев // Acta nature — 2016. — Том 8. — №4. — С. 127-133. DOI : <https://doi.org/10.32607/20758251-2016-8-4-118-123>
5. Muzamma M. et al. In silico Analysis of Renilla Muelleri, Photinus Pyralis and Metridia Longa Luciferase // – 2022. – Abasyn University – ISSN: 2663-1040
6. Bacart J. et al. The BRET technology and its application to screening assays //Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology. – 2008. – Т. 3. – №. 3. – С. 311-324. DOI : <https://doi.org/10.1002/biot.200700222>
7. Beljonne D. et al. Beyond Forster resonance energy transfer in biological and nanoscale systems //The journal of physical chemistry B. – 2009. – Т. 113. – №. 19. – С. 6583-6599. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp900708f>

8. Calabretta M. M. et al. Portable light detectors for bioluminescence biosensing applications: A comprehensive review from the analytical chemist's perspective //Analytica Chimica Acta. – 2022. – C. 339583. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339583>
9. Chudakov D. M. et al. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues //Physiological reviews. – 2010. – T. 90. – №. 3. – C. 1103-1163. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009>
10. De A. et al. Evolution of BRET biosensors from live cell to tissue-scale in vivo imaging //Frontiers in endocrinology. – 2013. – T. 4. – C. 131. DOI : <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00131>
11. Eremeeva E. V., Markova S. V., Vysotski E. S. Highly active BRET-reporter based on yellow mutant of Renilla muelleri luciferase //Dokl. Biochem. Biophys. – 2013. – T. 450. – C. 147-150. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1607672913030095>
12. Jiang Y. et al. Beyond luciferase-luciferin system: Modification, improved imaging and biomedical application //Coordination Chemistry Reviews. – 2023. – T. 481. – C. 215045. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215045>
13. Larionova M. D. et al. The smallest isoform of Metridia longa luciferase as a fusion partner for hybrid proteins //International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – T. 21. – №. 14. – C. 4971. DOI : <https://doi.org/10.3390/ijms21144971>
14. Marchenkov V. et al. Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) Allows Monitoring the Barnase-Barstar Complex In Vivo //Biophysica. – 2022. – T. 2. – №. 1. – C. 72-78. . DOI : <https://doi.org/10.3390/biophysica2010007>
15. Markova S. V. et al. Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod Metridia longa: a novel secreted bioluminescent reporter enzyme //Journal of Biological Chemistry. – 2004. – T. 279. – №. 5. – C. 3212-3217. DOI : <https://doi.org/10.1074/jbc.M309639200>
16. Markova S. V., Burakova L. P., Vysotski E. S. High-active truncated luciferase of copepod Metridia longa //Biochemical and biophysical research

communications. – 2012. – Т. 417. – №. 1. – С. 98-103. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.063>

17. Markova S. V., Larionova M. D., Vysotski E. S. Shining light on the secreted luciferases of marine copepods: Current knowledge and applications //Photochemistry and photobiology. – 2019. – Т. 95. – №. 3. – С. 705-721. DOI : <https://doi.org/10.1111/php.13077>

18. Ng J. et al. Bioluminescence-activated photodynamic therapy for luciferase transfected, grade 4 astrocytoma cells in vitro //Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2022. – Т. 38. – С. 102856. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102856>

19. Osipova Z. M. Bioluminescent imaging: new opportunities / Z. M. Osipova, A. S. Shcheglov, I. V. Yampolsky.//ВЕСТНИК РГМУ — 2018 — P. 87-90. DOI : <https://doi.org/10.24075/brsmu.2018.063>

20. Picard L. P. et al. Bioluminescence resonance energy transfer-based biosensors allow monitoring of ligand-and transducer-mediated GPCR conformational changes //Communications Biology. – 2018. – Т. 1. – №. 1. – С. 106. DOI: <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0101-z>

21. Roda A. et al. Progress in chemical luminescence-based biosensors: A critical review //Biosensors and Bioelectronics. – 2016. – Т. 76. – С. 164-179. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.06.017>

22. Sahoo H. Förster resonance energy transfer—A spectroscopic nanoruler: Principle and applications //Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews. – 2011. – Т. 12. – №. 1. – С. 20-30. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2011.05.001>

23. Shaner N. C. et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein //Nature biotechnology. – 2004. – Т. 22. – №. 12. – С. 1567-1572. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt1037>

24. Shaner N. C., Steinbach P. A., Tsien R. Y. A guide to choosing fluorescent proteins //Nature methods. – 2005. – T. 2. – №. 12. – C. 905-909. DOI: <https://doi.org/10.1038/NMETH819>
25. Sharifian S. et al. Light emission miracle in the sea and preminent applications of bioluminescence in recent new biotechnology //Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2017. – T. 172. – C. 115-128. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.05.021>
26. Stepanyuk G. A. et al. Expression, purification and characterization of the secreted luciferase of the copepod *Metridia longa* from Sf9 insect cells //Protein expression and purification. – 2008. – T. 61. – №. 2. – C. 142-148. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.05.013>
27. Subach O. M. et al. LSSmScarlet, dCyRFP2s, dCyOFP2s and CRISPRed2s, genetically encoded red fluorescent proteins with a large stokes shift //International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – T. 22. – №. 23. – C. 12887. DOI : <https://doi.org/10.3390/ijms222312887>
28. Tang Y. et al. A bioluminescence resonance energy transfer-based approach for determining antibody-receptor occupancy in vivo //Iscience. – 2019. – T. 15. – C. 439-451. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.05.003>
29. Tzertzinis G., Schildkraut E., Schildkraut I. Substrate cooperativity in marine luciferases //PloS one. – 2012. – T. 7. – №. 6. – C. e40099. DOI : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040099>
30. Weihs F. et al. Experimental determination of the bioluminescence resonance energy transfer (BRET) Förster distances of NanoBRET and red-shifted BRET pairs //Analytica chimica acta: X. – 2020. – T. 6. – C. 100059. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.acax.2020.100059>
31. Weihs F., Dacres H. Red-shifted bioluminescence Resonance Energy Transfer: Improved tools and materials for analytical in vivo approaches //TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2019. – T. 116. – C. 61-73. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.04.011>

32. Wu Y., Jiang T. Developments in FRET-and BRET-Based Biosensors //Micromachines. – 2022. – Т. 13. – №. 10. – С. 1789. DOI : <https://doi.org/10.3390/mi13101789>
33. Xu Y., Piston D. W., Johnson C. H. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1999. – Т. 96. – №. 1. – С. 151-156. DOI : <https://doi.org/10.1073/pnas.96.1.151>
34. Yang J. et al. Coupling optogenetic stimulation with NanoLuc-based luminescence (BRET) Ca⁺⁺ sensing //Nature communications. – 2016. – Т. 7. – №. 1. – С. 13268. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms13268>
35. Berthold Technologies. Приборостроительная компания : сайт. — 2023. — . — URL: <https://www.berthold.com/en/bioanalytic/knowledge/glossary/bret/> (дата обращения 03.02.2023)
36. FPbase :: The Fluorescent Protein Database : сайт. — 2023. — . — URL: <https://www.fpbases.org/> (дата обращения 05.04.2023)

