

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
«__» _____ 2024

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА
06.03.01 — Биология

Получение и изучение свойств гибридного белка, включающего мини-антитело
14D5a против ВКЭ и зеленый флуоресцентный
белок *Clytia gregaria* (cgreGFP-14D5a)

Руководитель	_____	<u>д.б.н., профессор</u>	<u>Л.А. Франк</u>
	подпись, дата	ученая степень, должность	Инициалы, фамилия
Научный консультант	_____		<u>Е.Е. Башмакова</u>
	подпись, дата		Инициалы, фамилия
Выпускник	_____		<u>Д.С. Перетяпкина</u>
	подпись, дата		Инициалы, фамилия

Красноярск 2024

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1 ОБЗОР НАУЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	5
1.1 Резонансный перенос энергии биолюминесценции (BRET).....	5
1.2 Целентеразин зависимые люциферазы.....	6
1.2.1 Люцифераза NanoLuc	8
1.3 Зеленый флуоресцентный белок (GFP)	9
1.3.1 Зеленый флуоресцентный белок <i>Aequorea victoria</i> (avGFP)	9
1.3.2 Зеленый флуоресцентный белок <i>Clytia gregaria</i> (cgreGFP).....	11
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	14
2.1 Вещества и реактивы	14
2.2 Создание генетической конструкции cgreGFP~14D5 α	15
2.3 Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i> XL1-Blue.....	16
2.4 Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i> XL1-Blue плазмидной ДНК.....	17
2.5 ПЦР-скрининг колоний	17
2.6 Подготовка отобранных ДНК для секвенирования.....	17
2.7 Получение гибридного белка cgreGFP-14D5 α	18
2.8 Получение гибридного белка 14D5 α -NanoLuc	19
2.9 Спектральные измерения	20
а) Электронные спектры поглощения были измерены на спектрофотометре UV-2700 (Shimadzu, Япония) в буфере PBS (таблица 1) при комнатной температуре. Измерения проводили в диапазоне 600–250 нм длин волн... 20	
2.10 Твердофазный микроанализ связывания гибридного белка cgreGFP-14D5 α с рекомбинантным белком E.....	21
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	22
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	30
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	32
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	33

ВВЕДЕНИЕ

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) относится к патогенам, вызывающим одно из самых тяжелых нейродегенеративных заболеваний человека. В настоящее время ВКЭ остается в тройке лидеров по заболеваемости в России. Инфекция распространена по всей лесной и лесостепной зоне умеренного пояса Евразийского континента. А крупные очаги отмечены в Восточной Сибири от Красноярского до Забайкальского края и занимают зону среднетаёжных и южно-таёжных лесов [1].

Для экстренной профилактики и терапии клещевого энцефалита применяют специфический сывороточный иммуноглобулин, получаемый из донорской крови, который несет в себе определенные недостатки. Во избежание применения необоснованной иммунопрофилактики необходимо быстрое, высокочувствительное выявление наличия или отсутствия вируса в клеще. Современный анализ клещей проводят либо колориметрическим твердофазным иммуноанализом, в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело, либо с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (РТ-ПЦР). Оба метода реализуют только в хорошо оборудованных специализированных условиях. При этом требуется высокая квалификация персонала. Для того чтобы проводить анализ быстро в одну стадию, существует несколько подходов. Один из них основан на явлении резонансной передачи энергии биолюминесценции на флуоресцентную молекулу с другим спектром излучения (BRET) (рис.1).

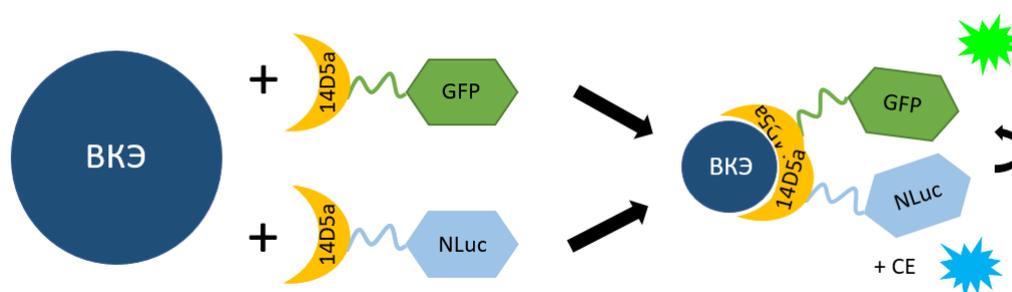


Рисунок 1. Механизм действия BRET (Пример).

С вирусной частицей специфично связываются две молекулы. В качестве биоспецифической части в обеих молекулах используется одноцепочечное мини-антитело 14D5 α , аффинное к капсидному гликопротеину — белку E вируса клещевого энцефалита. В качестве сигнальной части у одной молекулы служит люцифераза NanoLuc, а в другой молекуле сигнальная часть — это зеленый флуоресцентный белок GFP. При добавлении субстрата люциферазы (целентеразина или его аналогов) возникает биолюминесцентная реакция и испускается квант голубого цвета. При образовании комплекса эта энергия переносится на расположенный рядом акцептор — GFP, вызывая его флуоресценцию зеленого цвета. Если наблюдаем только голубую биолюминесценцию, то комплекс не образуется, что означает отсутствие вируса. Ранее в лаборатории биолюминесцентных и экологических технологий ИБФ СО РАН был получен и изучен один из компонентов этого комплекса – гибридный белок, включающий люциферазу NanoLuc и мини-антитело 14D5 α , аффинное к капсидному гликопротеину — белку E вируса клещевого энцефалита

Целью нашего исследования было получение бифункционального белка, включающего одноцепочечное мини-антитело 14D5 α , специфичное к белку E вируса клещевого энцефалита [2] и зеленый флуоресцентный белок медузы *Clytia gregaria* (cgreGFP) [3], как элемента однофазной аналитической системы для выявления ВКЭ на основе BRET. В соответствии с поставленной целью были **сформулированы следующие задачи:**

1. Сконструировать плазмиду, включающую ген гибридного белка cgreGFP-14D5 α ;
2. Получить рекомбинантные клетки *E. coli*, несущие эту плазмиду и синтезирующие целевой белок;
3. Выделить и очистить целевой белок из биомассы рекомбинантных клеток;
4. Изучить свойства гибридного белка cgreGFP-14D5 α .

ГЛАВА 1 ОБЗОР НАУЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Резонансный перенос энергии биолюминесценции (BRET)

Резонансный перенос энергии основан на фотофизическом явлении, при котором энергия возбуждения передается от донора к акцепторному хромофору безызлучательной диполь-дипольной связью. Эффективность такого явления зависит от расстояния между хромофорами, квантового выхода донора, спектрального перекрытия между излучением донора и поглощением акцептора, показателя преломления среды и коэффициента ориентации дипольных моментов излучения и поглощения [4]. Оптимизация коэффициентометрического отклика таких сенсоров часто включает в себя изменение относительного порядка доменов (слияние N- и C- концов), изменение длины линкера и использование белковых доменов с круговой перестановкой [5].

На данный момент существует два вида сенсоров, основанных на явлении резонансного переноса энергии, — это резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET) и биолюминесценции (BRET). Преимущество FRET-сенсоров в том, что их отклик является логометрическим, а это означает, что соотношение между излучением донора и акцептора обеспечивает меру концентрации лиганда, которая не зависит от абсолютной концентрации сенсора и менее чувствительна к фоновой флуоресценции [6]. Однако у таких сенсоров есть и ряд ограничений, такие как фото-обесцвечивание и фототоксичность, что не позволяет производить измерения в течение длительного периода времени. Страдают измерения флуоресценции и от автофлуоресценции и рассеяния света, что затрудняет визуализацию *in vivo* и измерения в сильно поглощающих и рассеивающих средах, таких как кровь [7]. Эти проблемы решаются использованием BRET-датчиков.

В BRET-датчиках донорский флуоресцентный домен заменен ферментом люциферазой, который, катализируя окисление субстрата,

испускает квант света. Анализ на основе биолюминесцентного донора обладают высокой чувствительностью благодаря низкому фону, который обеспечивается отсутствием аутофлуоресценции и рассеяния [4].

Наиболее популярны в BRET-сенсорах люциферазы: светляка *Photinus pyralis* — белок массой 61 кДа, излучающий оранжевый свет при λ_{\max} 562 нм окислением D-люциферина, однако его зависимость от АТФ и Mg^{2+} сужают круг ее использования в качестве биолюминесцентных меток [8]; мягкого коралла *Renilla*, которая представляет собой целентеразин зависимую люциферазу молекулярной массой 36 кДа, катализирующий прямое окисление имидазопиразиноподобных субстратов с образованием диоксетанового промежуточного продукта, который при выделении разлагается до углекислого газа и аниона целентерамида в возбужденном состоянии, излучением синего света с λ_{\max} 480 нм происходит при переходе в основное состояние [4].

1.2 Целентеразин зависимые люциферазы

Люциферазы стали важными компонентами биологических исследований. Они повсеместно используются в качестве репортеров. Люциферазы, использующие целентеразин в качестве субстрата, не зависят от АТФ и, как правило, требуют для свечения только молекулярного кислорода в дополнение к субстрату, что позволяет использовать их в качестве биолюминесцентных меток [8]. Группа целентеразин зависимых люцифераз распространена в биолюминесцентных системах большинства известных морских организмов. Среди таких систем есть два резко отличающихся типа — Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины и сами люциферазы [9]. Люциферазы функционируют в соответствии с классической кинетикой фермент–субстрат с образованием целентерамида, CO_2 и кванта голубого цвета (рис. 1а). Ca^{2+} -регулируемый фотопротеин представляет собой стабильный комплекс, включающий полипептидный апофотопротеин (ароPhP) и предокисленный

субстрат-2-гидропероксицелентеразин. Продуктами реакции окисления CTZ являются: комплекс apoPhP с СТМ и тремя Ca^{2+} , CO_2 и в виде короткой вспышки. Это предполагает принципиально линейную зависимость между количеством белка и излучаемым светом.

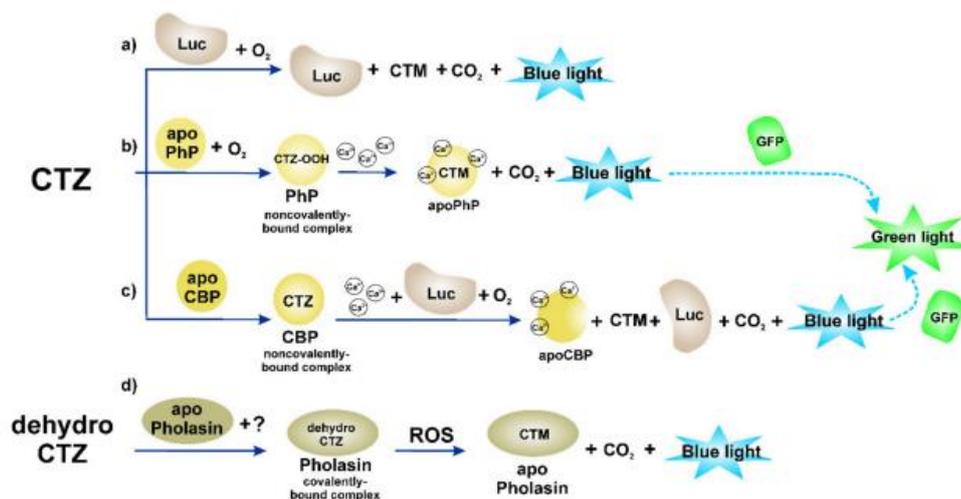


Рисунок 2. Вариации целентеразин-зависимых биолюминесцентных систем. (a–d) пути окисления целентеразина с выделением голубого цвета. Luc—люцифераза; apoPhP—апофотопротейн; apoCBP—апоцелентеразинсвязывающий белок; CTZ и СТМ—целентеразин и целентерамид [9].

Достойна внимания и CTZ-зависимая биолюминесцентная система, обнаруженная в мягком коралле *Renilla*. Его особенная черта в том, что целентеразин надежно упакован в полость Ca^{2+} -зависимого целентеразин-связывающего белка (СВР) (рис. 1c) [10]. Биолюминесцентная вспышка возникает при связывании ионов кальция с СВР, вследствие чего целентеразин становится доступным в качестве субстрата для люциферазы [11].

Существует еще один вид фотопротейна - фолазин, использующий производное CTZ в качестве субстрата с биолюминесцентной системой, значительно отличающейся от системы фотопротейнов, регулируемых Ca^{2+} (рис. 1d). В настоящее время он классифицируется как чувствительные к активным формам кислорода фотопротейны содержащие гликолипопротеин с ковалентно связанным (через сульфгидрильную группу одного из остатков цистеина) дегидроцелентеразином как источника излучения света [9].

Работы по модификации люциферазы позволяют получать ее улучшенные варианты с повышенной яркостью, другими спектральными свойствами или биодоступностью. Большинство разработок основаны на люциферазе *Renilla*. Однако она обладает ограниченной термодинамической стабильностью и быстрым снижением сигнала, что затрудняет измерения, зависящие от времени [4]. Для улучшения термостабильности методом сайт-направленного мутагенеза был получен белок Rm7 [12,13]. Остальные недостатки были устранены при разработке NanoLuc, сконструированной на основе каталитического домена люциферазы, выделенной из глубоководной креветки *Oplophorus gracilirostris*.

1.2.1 Люцифераза NanoLuc

Спектральный профиль люциферазы NanoLuc имеет максимум излучения при 460 нм, [14]. А это значит, что при применении ее в сочетании с репортерами излучающими свет с большей длиной волны, например люциферазы светлячка, можно получать двойные люциферазные анализы с хорошо разделенными спектрами.

Кроме того, NanoLuc предпочтительнее в BRET-анализе из-за более яркого свечения и узкого спектра свечения. Ее термостабильность высока — активность сохраняется при температуре до 55 °С или в культуральной среде при 37° С в течение более 15 ч, активность остается неизменной и в широком диапазоне рН от 7 до 9 [14].

Таким образом, улучшенная люминесценция, высокая стабильность, узкий спектр, и небольшой размер (19 кДа) — делают эту люциферазу привлекательным кандидатом в качестве метки для различных применений. Структуру NLuc можно легко адаптировать для удовлетворения различных экспериментальных потребностей. Сочетание всех характеристик делает ее полезной в качестве клеточного репортера, генерирующего

высококочувствительный сигнал с физической структурой, устойчивой к воздействиям окружающей среды.

1.3 Зеленый флуоресцентный белок (GFP)

У большинства светящихся кишечнорастных в фотогенных клетках присутствует зеленый флуоресцентный белок, благодаря которому появляется способность излучать зеленый свет. Само излучение происходит при переносе энергии, вырабатываемой фотопротеином или системой целентеразин-люцифераза, на молекулы GFP. Максимум флуоресцентного излучения отмечается при 508–509 нм, хотя известны случаи максимума при 497 нм и 498 нм. Стоит отметить также, что GFP демонстрируют пик возбуждения флуоресценции в диапазоне 450–500 нм, в дополнение к типичному белковому пику при 280 нм [15].

Молекула зеленого флуоресцентного белка укладывается в структуру, напоминающую вид цилиндра с короткими спиральными сегментами на концах. Образована структура 11 нитями по 3 бета-листам, внутри имеющие альфа-спираль с хромофором, его формирование связано с автокаталитической реакцией дегидрогенизации и окисления молекулярным кислородом — остатка тирозина полипептидной цепи. В результате реакции окисленного тирозина с глицином, находящимся в той же цепи, возникает система сопряженных связей, способная к флуоресценции. Она поглощает «ультрафиолетовые» или «синие» фотоны и испускает в ответ фотоны с меньшей энергией, соответствующие сине-зеленому свету [15].

1.3.1 Зеленый флуоресцентный белок *Aequorea victoria* (avGFP)

Взрослый организм *Aequorea victoria* характеризуется радиальной симметрией формы тела, простыми структурами, состоящими из двух слоев клеток, окружающих внутреннее пространство и напоминают прозрачный полусферический зонтик. По краю зонтика равномерно распределены

световые органы, состоящие примерно из 200 крошечных гранул. При замачивании особи в растворе KCl отмечается люминесценция световых органов зеленого цвета, при замачивании в дистиллированной воде наблюдается более тусклое зеленое свечение, постепенно превращающиеся в синее по мере цитолиза клеток [15].

Зеленое свечение обусловлено присутствием зеленого флуоресцентного белка в фотогенных клетках *Aequorea*. Впервые флуоресцирующее вещество в *Aequorea* было обнаружено Дэвенпортом и Николом в 1955, но выделено и идентифицировано как белок в 1961 году О. Шимомура и Ф. Джонсоном [16].

avGFP — относительно стабильный белок, устойчивый к денатурации протеазами и детергентами. Его молекулярная масса равна около 27 000 Да [15]. Спектр излучения флуоресценции показывает резкий пик с максимумом при 508-509 нм. Квантовый выход флуоресценции составляет приблизительно 0,8 [17].

При низких концентрациях (<0.5 мг/мл) *Aequorea* GFP имеет вид мономера, при концентрации более 5 мг/мл приобретает димерную форму. Спектр поглощения мономера показывает три пика: 280 нм, 397 нм и 475 нм, из которых последний пик значительно уменьшается при димеризации [15].

Экспрессия avGFP в живых организмах возможна как самого GFP, так и в качестве метки локализации белков в различных биологических системах [15]. В настоящее время GFP широко используется в качестве маркерного белка в медицинских и биологических исследованиях. Благодаря его уникальной способности синтезировать хромофор внутри себя, без необходимости во внешних субстратах [18].

Кроме того, зеленый флуоресцентный белок используется для изучения трансфекции различных типов первичных клеток и клеточных линий в целях разработки стратегии генной терапии рака. На примере клеток мышинной меланомы B16F10 и мышинной карциномы CT26 исследовали динамику экспрессии репортерного гена GFP. Ученные сделали вывод, что

эффективность трансфекции была выше в клетках В16F10, чем в клетках СТ26, время начала экспрессии флуоресцентного белка также было короче в клетках В16F10. А интенсивность флуоресценции, наоборот, была выше в клетках СТ26 [19]. Как итог получилось прояснить некоторую динамику экспрессии репортерных генов в линиях раковых клеток после электротрансферации генов.

А в 2022 году было проведено исследование для определения эффективности трансфекции генно-инженерных конструкций с целью диагностики и терапии опухолей *in vivo*. Для анализа доставки экспрессионной плазмиды использовали репортерный белок GFP, наблюдая за его распределением в клетках меланомы В16 и дистантных органах мышей. Полученные результаты показали, что у исследуемых мышей при введении липокомплекса плазмиды внутрибрюшинно не было замечано патологий и

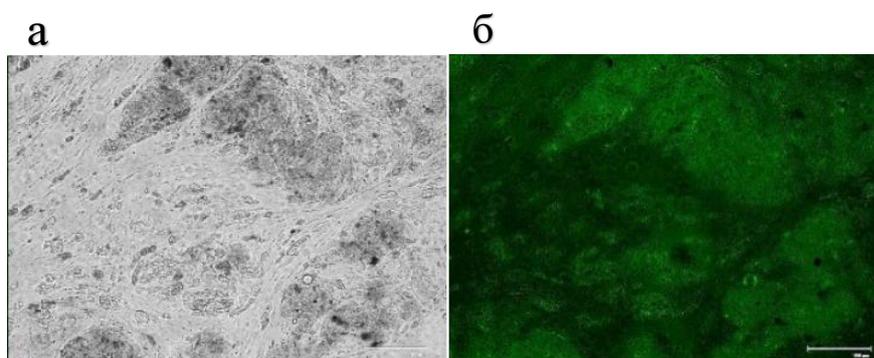


Рисунок 3. Опухолевый узел меланомы В16 мыши С57В16 (а) при трансфекции Invivofectamine плазмиды GFP (б) [19].

изменений внутренних органов (легких, печени, почек). При использовании трансфектанта Invivofectamine в опухолевом узле обнаруживались GFP положительные клетки (рис. 3). Что указывает на перспективность использования трансфекции генно-инженерных конструкций на клетки меланомы для целевого воздействия [20].

1.3.2 Зеленый флуоресцентный белок *Clytia gregaria* (cgreGFP)

В лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН была клонирована кДНК, кодирующая GFP из биолюминесцентной медузы *Clytia gregaria*. В результате скрининга всей библиотеки кДНК cgreGFP было выделено шесть транскриптов одного гена: cgreGFP2, 4, 10, 12, 25 и 45 [18], вероятно полученных в следствие альтернативного сплайсинга, неточного расщепления после сигнала полиаденилирования и/или отжига олиго(dT) праймера на 3'-нетранслируемой области.

Полученный рекомбинантный белок cgreGFP является облигатным димером. Его молекулярная масса составляет 26.4 кДа. Спектр поглощения показывает два пика на 280 нм с молярным коэффициентом экстинкции 38 650 М⁻¹см⁻¹ и на 485 нм с 63 030 М⁻¹см⁻¹. Отношение коэффициентов поглощения составляет 1.62. Спектр флуоресценции имеет максимум при 500 нм с плечом при 540 нм. Одним из важных свойств является устойчивость к изменениям pH в диапазоне от 5.5 до 8.5 [18].

Общая степень идентичности между аминокислотной последовательностью cgreGFP и последовательностью avGFP составляет 42%, однако три остатка, образующих хромофор, идентичны (рис. 4). Несмотря на

cgreGFP	1	MTALTEGAKLFEKEIPYITELEGDVEGMKFIKGEETGDATTGTIKAKYI
avGFP	1	---MSKGEEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLTLLKFI
cgreGFP	51	CTTGDLVPWPATILSSL SYGVVCF AKYPRH--IADFFKSTQPDGYSQDRI
avGFP	48	CTTGKLPVPWPTLVTT SYGVVCF SRYPDHMKQHDFFKSAMPEGVQERT
		F64L S72A
cgreGFP	99	ISFDNDGQYDVKAQVYENGLYNRVTVKGTGFKSNGNILGMRVLYHSPP
avGFP	98	IFFKDDGNYKTRAEVK FE GDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNS
		F99S S147P
cgreGFP	149	HAVYILPDRKNGMKIEYNKAFDVMGGGHQMARHAQFNKPLGAWEEEDYPL
avGFP	148	HNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPD
		S175G
		Identities
cgreGFP	199	YHHLTVWTSFGKDPDDDET DHLTIVEVIKAVDL -----ET YR
avGFP	198	NHYLSTQSALS KDPNE -KR DH MV LL EFVTAAGIT HGMDELYK 42%

Рисунок 4. Выравнивание аминокислотных последовательностей cgreGFP и avGFP (P42212). Буквы под линиями выравнивания указывают на мутации, которые улучшают avGFP в качестве флуоресцентного маркера *in vivo*, которые уже присутствуют в последовательности cgreGFP.

это GFP из *Clytia gregaria* имеет два максимума поглощения в отличие от GFP из *Aequorea victoria*, который демонстрирует пик поглощения при 278 нм, 395 нм и 475 нм [15]. Пик возбуждения при 395 нм обусловлен нейтральной формой фенола хромофора, а пик при 475 нм — анионом хромофора. Хромофор *sgreGFP* же находится в форме фенолят-аниона. Такой причине послужила замена комбинаций мутаций, вызывающие ионизацию фенола хромофора в *avGFP*, соответствующих F64L и S72A [21] в *avGFP* (рис. 4)

Рекомбинантный белок *sgreGFP* будучи нечувствительным к pH обладает высокой яркостью и квантовым выходом флуоресценции при возбуждении на длине волны, подходящих для клеток млекопитающих, что позволяет использовать его в качестве флуоресцентного маркера для внутриклеточной визуализации. Более того *sgreGFP* обладает свойствами, позволяющим использовать его в экспериментах с FRET и BRET [18].

Исходя из анализа литературных данных, можно сделать вывод о перспективности разработки аналитических систем на основе BRET для создания различных аналитических систем, в том числе для исследований в однофазной среде.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Вещества и реактивы

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

Название	Состав
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
LB-среда	20 г/л бакто-триптона; 10 г/л дрожжевого экстракта; 5-7 г/л NaCl pH 7,4
LB-агар	1,5% агара в LB-среде
Буфер А	50 mM 0,1 M NaH ₂ PO ₄ , 0,1 M K ₂ HPO ₄ pH 7,0; 0,3 M NaCl, 5 mM имидазол
Буфер Б	50 mM 0,1 M NaH ₂ PO ₄ , 0,1 M K ₂ HPO ₄ pH 7,0; 0,3 M NaCl, 0,5 M имидазол
Буфер PBS	50 mM 0,1 M NaH ₂ PO ₄ , 0,1 M K ₂ HPO ₄ pH 7,0; 0,15 M NaCl
Буфер TE	20 mM Трис-HCl pH 7,0; 5 mM ЭДТА
Буфер TAE (50x)	2 M Tris; 50mM ЭДТА; уксусная кислота (pH=8,0)
Mg ²⁺ /Ca ²⁺ раствор	80 mM MgCl ₂ ; 20 mM CaCl ₂
Промывочный буфер	PBS; 0,1% Tween; 20, 5 mM ЭДТА
Лизирующий буфер	0,5 M Трис, pH 6,8; 10% SDS; 100% глицерол; 0,05% бромфеноловый синий; 5% β-меркаптоэтанол

В работе были использованы реактивы: бакто-триптон (Panreac, Испания); дрожжевой экстракт (Медиген, Россия); агар бактериологический (ДИА-М, Россия); изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (ДИА-М,

Россия); ампициллин (Синтез, Россия); целентеразин (CE) (Pinetop, США); этанол; бычий сывороточный альбумин (БСА).

Кальций хлорид (Sigma-Aldrich, США), диметил сульфоксид (PanReac Applichem, США), мочеви́на, ЭДТА-натриевая соль, SMCC, 2-иминотиолан (Thermo Scientific, США).

В качестве клеток-хозяев использовали бактерий *E. coli* штаммы XL1-Blue, *E. coli* Rosetta-gami.

Для выделения плазмидной ДНК использовали набор Plasmid Miniprep (Евроген, Россия).

Для электрофореза белков использовали акриламид (Медиген, Россия); ТЕМЕД (Helicon, Россия); персульфат аммония, додецилсульфат натрия (BioRad, США); стандартные смеси белков для электрофореза (BioRad, США).

Концентрацию белка измеряли по Лоури набором Dc Protein Assay (BioRad, США) по инструкции производителя.

Для твердофазного микроанализа использовали рекомбинантный белок ДЕЗ вируса клещевого энцефалита, полученный А.Н. Кудрявцевым (ЛБЭТ ИБФ СО РАН) [23].

2.2 Создание генетической конструкции *cgreGFP~14D5α*

ДНК-вставку, содержащую ген *cgreGFP*, получали ПЦР синтезом, где в качестве матрицы использовали плазмиду GFP27. И следующие праймеры: Dn_GFP_GGS 5'-AgAACCACCAgAACCACCCACggTATgTTTCCAAATCAACA-3' и Dn_GGS_NotI 5'-gCTgCggCCgCTgAgCCACCAgAACCACCAgAACCACCC-3' кодирующий линкер (GGG)₄ с сайтом рестрикции NotI, Up_Nde_GFP 5'-CATATgACTgCACTTACCgAAggAgC-3' содержащий сайт рестрикции NdeI.

ДНК-вставку, содержащую ген 14D5α, получали ПЦР синтезом, где в качестве матрицы использовали рекомбинантную плазмидную ДНК pFLAG-sc14D5a-Rm7, полученную ранее [21]. И следующие праймеры:

Up с сайтом рестрикции NotI: 5'-
GAGGCGGCCCGCCGAGGTGCAGCTGGTGC-3' и Dn 5'-
CTCGAATTCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCACGTTTGATTTCCAG-
3' с сайтом рестрикции EcoRI.

Аmplification проводили в условиях: предварительная денатурация – 30 сек при 98°C; 35 циклов – 10 с при 98°C, 30 с при 68°C, 30 сек при 72°C; заключительная стадия – 10 мин при 72°C.

Продукт амплификации расщепляли ферментами рестрикции CsiNI (изошизомер NotI) и Sfr274I (изошизомер XhoI) для cgreGFP, FauND I (изошизомер NdeI) и CsiNI (СибЭнзим, Россия) для 14D5α в течение 2 ч при 37°C.

ДНК векторной плазмиды pFLAG и pET22b обрабатывали ферментами рестрикции NdeI и EcoR аналогично, после чего дефосфорилировали с помощью щелочной фосфатазы CIP (NEB, США). ПЦР-фрагменты и линеаризованный вектор очищали электрофоретически и проводили лигирование.

2.3 Приготовление компетентных клеток *E. coli* XL1-Blue

В колбу с LB-средой перенесли 1 мл суспензии клеток ночной культуры XL1-Blue и инкубировали при 37°C до оптической плотности OD₆₀₀ 0.4-0.5, после чего перенесли клетки на лед на 5 минут. Культуру разделили на две пробирки по 45 мл и центрифугировали 10 минут при 3000g, 4°C, супернатант сливали. Клеточный осадок ресуспендировали Mg²⁺/Ca²⁺ раствором (таблица 1). Инкубировали на льду в течение 30 минут, после чего центрифугировали 10 минут при 3000g, 4°C, супернатант сливали. Ресуспендировали раствором 100 mM CaCl₂, после чего перенесли пробирки на лед на 20 мин. Объединили содержимое двух пробирок и добавили 80%-ный глицерол. Клетки хранили при -80°C.

2.4 Трансформация компетентных клеток *E. coli* XL1-Blue плазмидной ДНК

К суспензии компетентных клеток штамма *E. coli* XL1-Blue (43 мкл) добавляли 7 мкл раствора плазмидной ДНК после лигирования, и инкубировали на льду 30 минут. Затем проводили «тепловой шок»: клетки опускали в водяную баню WB-4MS (Biosan, Латвия) при 42°C на 45 сек и снова перенесли на лед. После этого в пробирку к клеткам добавили SOC-среду в количестве 450 мкл и инкубировали 1 час при температуре 37°C. Высеивали на LB-агар, содержащий ампициллин (200 мкг/мл), и растили при 37°C.

2.5 ПЦР-скрининг колоний

Полученные колонии трансформированных клеток XL-1 Blue проверяли на наличие плазмиды на амплификаторе MJ Mini («Bio-Rad», США) по следующей программе: 95°C в течение 1 минуты; 25 циклов (95°C — 30 секунд, 56°C — 30 секунд, 72°C — 1 минута); 72°C в течение 7 минут. Клетки предварительно разрушили при температуре 95°C на протяжении 10 минут и центрифугировали 2 минуты при 10000 rpm. 12 мкл реакционной смеси (на одну исследуемую колонию) содержали 2 мкл 10-кратного буфера Taq, 0,3 мМ каждого dNTP (СибЭнзимб Россия), 2 е.а. полимеразы Taq (СибЭнзим, Россия), 8 мкл клеточного супернатанта, содержащего ДНК, и по 0,4 мМ следующих праймеров (Биосан, Россия): праймер pFLAG 3 seq — 5'-GCTTCTGCGTTCTGATTТААТСТG-3', праймер pFLAG 5 seq — 5'-АТААСGGTTCTGGCAAАТАТТСТG-3' для варианта с плазмидой pFLAG и с праймерами T7 pro и T7 ter для варианта с плазмидой pET22b.

ПЦР-продукты проверяли электрофорезом в агарозном геле.

2.6 Подготовка отобранных ДНК для секвенирования

В колбу, содержащую 5 мл LB-среды и 5 мг/мл ампициллина, добавили 3-4 колонии *E. coli* XL1-Blue, содержащих плазмиду pET22b-GFP-14D5a, и инкубировали ночь в термошейкере при 160 об/мин, 37°C.

Клетки осаждали центрифугированием при 8000g, 2 мин, супернатант сливали. К осадку добавляли ресуспендирующий раствор и вортексировали до растворения осадка, для разрушения клеток добавляли лизирующий раствор. Плазмиду отделяли от клеточных остатков с помощью нейтрализующего раствора, после чего центрифугировали при 12000g 10 мин, супернатант переносили на спин-колонку и центрифугировали 30 с при 7000g, фильтрат удаляли. В спин-колонку добавляли раствор для удаления эндотоксикантов, центрифугировали, фильтрат удаляли. Далее добавляли промывочный раствор и центрифугировали. Спин-колонку переносили в пробирку 2 мл и добавляли элюирующий раствор, после чего центрифугировали.

40 мкл раствора выделенной плазмиды переносили в пробирку и отправляли на секвенирование (ЦКП Геномика, г. Новосибирск).

2.7 Получение гибридного белка cgreGFP-14D5a

К суспензии компетентных клеток штамма *E. coli* Rosetta gami (49 мкл) добавили 1 мкл раствора плазмидной ДНК, и инкубировали на льду 30 минут. Затем проводили «тепловой шок»: клетки опускали в водяную баню WB-4MS (Biosan, Латвия) при 42°C на 45 сек и снова переносили на лед. После этого в пробирку к клеткам добавляли SOC-среду в количестве 450 мкл и инкубировали 1 час при температуре 37°C. Высеивали на LB-агар, содержащий ампициллин (200 мкг/мл), и растили при 37°C.

Культивировали при активном перемешивании в LB-среде, содержащей 200 мгк/мл ампициллина, при 37°C со встряхиванием. При оптической плотности культуры 0,7 охлаждали до 18°C, вносили 0,5 мМ изопропил- β D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ; Диа-М, Россия) и продолжали культивировать при 18°C в течение 20 ч.

Клеточную массу соответствующих рекомбинантных штаммов *E. coli* ресуспендировали в буфере А (таблица 1), разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т («Академприбор», Украина) 8 раз по 20 сек, на льду. Полученную смесь центрифугировали 15 мин при 6000g, 4°C, супернатант перенесли в другую пробирку.

Гибридный белок очищали металл-аффинной хроматографией на колонке TALON® Metal Affinity Resin (Clontech, США), уравновешенной буфером А и элюировали белок буфером Б.

Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и концентрировали 5 мин при 4500g. Далее полученный белок переводили в буфер PBS (таблица 1) на концентрационной ячейке Amicon Ultra-4 10K Centrifugal Filter Devices (Merck, США). Чистоту белкового препарата оценивали по электрофорезу белков в ПААГ по Лэммли. оценку чистоты полученных препаратов проводили при помощи программного обеспечения Alpha Easy™ (Alpha Innotech Co, США).

2.8 Получение гибридного белка 14D5α -NanoLuc

К суспензии компетентных клеток штамма *E. coli Rosetta gami* (49 мкл) добавили 1 мкл раствора плазмидной ДНК, и инкубировали на льду в течение 30 минут. Затем проводили «тепловой шок»: клетки опускали в водяную баню WB-4MS (Biosan, Латвия) при 42°C на 45 сек и снова перенесли на лед. После этого в пробирку к клеткам добавили SOC-среду в количестве 450 мкл и инкубировали 1 час при температуре 37°C. Высеивали на LB-агар, содержащий ампициллин (200 мкг/мл), и растили при 37°C.

Культивировали при активном перемешивании в LB-среде, содержащей 200 мкг/мл ампициллина, при 37°C со встряхиванием. При оптической плотности культуры 0,7 охлаждали до 23°C, вносили 0,5 мМ изопропил-βD-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ; Диа-М, Россия) и продолжали культивировать при 23°C в течение 20 ч.

Клеточную массу соответствующих рекомбинантных штаммов *E. coli* ресуспендировали в буфере А (таблица 1), разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т («Академприбор», Украина) 8 раз по 20 сек, на льду. Полученную смесь центрифугировали 10 мин при 7000g, 4°C, супернатант перенесли в другую пробирку и центрифугировали его при 7000g, 10 мин.

Гибридный белок 14D5 α -NL 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 линейном градиенте концентрации имидазола (50-200 мМ) в буфере Б (таблица 1). Белок элюировали при 0,11 М имидазола. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и концентрировали 10 мин при 6000g. Далее полученный белок переводили в буфер PBS (таблица 1) гель-фильтрацией на колонке HiTrap Desalting Columns (GE Healthcare, США).

Чистоту белкового препарата оценивали по электрофорезу белков в ПААГ по Лэммли.

2.9 Спектральные измерения

а) Электронные спектры поглощения были измерены на спектрофотометре UV-2700 (Shimadzu, Япония) в буфере PBS (таблица 1) при комнатной температуре. Измерения проводили в диапазоне 600–250 нм длин волн.

б) Спектры биолюминесценции и флуоресценции были измерены на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (Agilent Technologies, США). Все спектры были скорректированы на чувствительность ФЭУ к различным длинам волн с использованием программного обеспечения прибора. Спектры биолюминесценции люцифераз измеряли в растворах PBS.

Биолюминесценцию инициировали впрыскиванием целентеразина в том же буфере. Все спектральные измерения проводили при комнатной температуре.

2.10 Твердофазный микроанализ связывания гибридного белка cgreGFP-14D5 α с рекомбинантным белком E

В лунки непрозрачного микропланшета вносили по 100 мкл раствора рекомбинантного белка ДЕЗ (1; 0,3; 0,1 мкг/мл, в PBS), в контрольные лунки добавляли 100 мкл PBS, инкубировали при 37°C час, промывали промывочным буфером (таблица 1) и блокировали свободную поверхность лунок 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (37 °C, 1 час). После промывки в лунки вносили раствор полученного гибридного белка cgreGFP-14D5 α , инкубировали в течение 40 минут при комнатной температуре. После промывки флуоресцентный сигнал образовавшихся на поверхности комплексов измеряли с помощью планшетного люминометра Mithras LB 940 (Berthold, Germany): λ_{Ex} = 485 нм, λ_{Em} = 520/10 нм. От полученных результатов вычитали сигнал фоновой лунки для снижения ошибки измерений.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Страницы изъяты с 22 по 29 в связи с авторскими правами

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная работа посвящена получению и изучению свойств гибридного белка cgreGFP-14D5 α , содержащего специфичное одноцепочное мини-антитело к ВКЭ и зеленый флуоресцентный белок. В ходе проведенного исследования были получены следующие результаты:

1. Сконструирована плаزمида, включающая ген гибридного белка cgreGFP-14D5 α ;
2. Получены рекомбинантные клетки E.coli, несущие эту плазмиду и синтезирующие целевой белок. Показано, что «созревание» домена cgreGFP с появлением зеленой окраски колоний и способности флуоресцировать под ультрафиолетовым облучением происходит в течение не менее 7 дней;
3. Выделен целевой белок в высокоочищенном виде из цитоплазматической фракции и телец включения рекомбинантных клеток;
4. Твердофазным микроанализом исследована способность полученного гибридного белка связывать капсидный белок E вируса клещевого энцефалита. Показано, что его экспрессия в виде нерастворимых телец включения препятствует формированию пространственной структуры домена антитела. Белок, выделенный из цитоплазматической фракции, содержит правильно сформированный домен мини-антитела и обладает способностью связывать целевую молекулу белка E;
5. Электронный спектр поглощения гибридного белка содержит полосы в ультрафиолетовой и видимой областях, отношение интенсивностей составляет $OD_{280}:OD_{485} = 1: 0,43$, что отличается от такового исходного cgreGFP ($OD_{280}:OD_{485} = 1: 1,35$) благодаря наличию полипептидного

домена мини-антитела. Спектр флуоресценции целевого белка не отличается от такового исходного cgreGFP ($\lambda_{\text{max}}=500$ нм, $\lambda_{\text{Ex}}=470$ нм).

Таким образом, в результате проведенного исследования нами получен новый бифункциональный белок cgreGFP-14D5 α , обладающий специфическими функциями доменов, которые в нем присутствуют: способностью домена мини-антитела «узнавать» и связываться с целевым белком-мишенью и флуоресцентной активностью домена зеленого флуоресцентного белка.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- BRET — резонансный перенос энергии биолюминесценции
- CBP — целентеразин-связывающий белок
- CTZ — целентеразин
- DMSO – диметилсульфоксид
- FRET — резонансный перенос энергии флуоресценции
- GFP — зеленый флуоресцентный белок
- LB-среда (Lysogeny broth)
- SDS — додецилсульфат натрия (sodium dodecyl sulfate)
- SOC-среда (Super Optimal broth with Catabolic repressor)
- SMCC – сукцинимидный эфир 4-(N-малеимидометил-) циклогексановой кислоты
- P — фосфатный буфер
- PBS – 50 mM K-Na фосфатном буфере pH 7.0; 0.15 M NaCl
- Im — имидазол
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ВКЭ — вирус клещевого энцефалита
- ДЕЗ — домен белка E вируса клещевого энцефалита
- ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИПТГ — изопропил- β -D-тиогалактопиранозид
- ПААГ — полиакриламидный гель
- п.о. – пара нуклеотидных оснований
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году». 2023. 368 с. — URL: <https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/b50/t4kqksh4b12a2iwjnha29922vu7naki5/GD-SEB.pdf>. (дата обращения: 7.12.2023)
2. Baykov, I. K. A protective chimeric antibody to tick-borne encephalitis virus / I. K. Baykov, A. L. Matveev, O. V. Stronin, et al. // *Vaccine*. — 2014. — Vol. 3, Iss. 29. — P 3589-3594.
3. Markova, S. V. Green-fluorescent protein from the bioluminescent jellyfish *Clytia gregaria* cDNA cloning, expression, and characterization of novel recombinant protein. / S. V. Markova, L. P. Burakova, L.A. Frank, et al. // *Photochem. Photobiol. Sci.* — 2010. — Vol. 9. — P. 757-765.
4. Lindenburg, L. Engineering Genetically Encoded FRET Sensors / L. Lindenburg, M. Merckx // *Sensors*. — 2014. — Vol. 14, Iss. 7. — P. 11691-11713.
5. Arts, R. Engineering BRET-Sensor Proteins / R. Arts, Stijn J.A. Aper, M. Merckx // *Methods in Enzymology*. — 2017. — Vol. 589. — P. 87-114.
6. Campbell, R. E. Fluorescent-Protein-Based Biosensors: Modulation of Energy Transfer as a Design Principle / R. E. Campbell // *Analytical Chemistry*. — 2009. — Vol. 81, Iss. 15. — P. 5972-5979.
7. Boute, N. The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET / N. Boute, R. Jockers, T. Issad // *Trends in Pharmacological Sciences*. — 2002. — Vol. 23, Iss. 8. — P. 351-354.
8. Loening, A. M. Consensus guided mutagenesis of *Renilla luciferase* yields enhanced stability and light output / A. M. Loening, T. D. Fenn, A. M. Wu, S. S. Gambhir // *Article*. — 2006. — Vol. 19, Iss. 9. — P. 391-400.
9. Krasitskaya, V. V. Coelenterazine-Dependent Luciferases as a Powerful Analytical Tool for Research and Biomedical Application / V. V. Krasitskaya, E. E. Bashmakova, L. A. Frank // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2020. — Vol. 21, Iss. 20. — P. 7465.
10. Stepanyuk, G. A. Crystal structure of coelenterazine-binding protein from *Renilla muelleri* at 1.7 Å: why it is not a calcium-regulated photoprotein / G. A. Stepanyuk, Z. Liu, S. S. Markova, L. A. Frank, J. Lee, E. S. Vysotski, B. Wang // *Photochemical & Photobiological Sciences*. — 2008. — Vol. 7. — P. 442-447.
11. Stepanyuk, G. A. Structure based mechanism of the Ca²⁺-induced release of coelenterazine from the *Renilla* / G. A. Stepanyuk, Z. Liu, E. S. Vysotski, J. Lee, J. P. Rose, B. Wang // *Proteins*. — 2009. — Vol. 74, Iss. 3. — P. 583-593.
12. Titushin, M.S. Coelenterazine-binding protein of *Renilla muelleri*: cDNA cloning, overexpression, and characterization as a substrate of luciferase / M.S. Titushin, S.V. Markova, L.A. Frank, N.P. Malikova, G.A. Stepanyuk, J. Lee, E.S. Vysotski. // *Photochem. Photobiol. Sci.* — 2008 — Vol. 7. — P.189-196.

13. Stepanyuk, G.A. Coelenterazine-v ligated to Ca²⁺-triggered coelenterazine-binding protein is a stable and efficient substrate of the red-shifted mutant of *Renilla muelleri* luciferase / G.A. Stepanyuk, J. Unch, N.P. Malikova, S.V. Markova, J. Lee, E.S. Vysotski. // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2010 — Vol. 398. — P. 1809-1817.
14. Hall, M. P. Engineered Luciferase Reporter from a Deep Sea Shrimp Utilizing a Novel Imidazopyrazinone Substrate / M. P. Hall, J. Unch, B. F. Binkowski, et al. // *ACS Chemical Biology.* — 2012. — Vol. 7, Iss. 11. — P. 1848-1857.
15. Shimomura, O. *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*, World Scientific Publishing Co., Singapore, — 2006.
16. Shimomura, O. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea* / O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saigo // *Journal of Cellular and Comparative Physiology.* — 1962. — Vol. 59, Iss. 3. — P. 223-239.
17. Morise H. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea* / H Morise, O Shimomura, F. H. Johnson, J Winant // *Biochemistry.* — 1974. — Vol. 13, Iss. 12. — 2656-2662.
18. Markova, S. V. Green-fluorescent protein from the bioluminescent jellyfish *Clytia gregaria*: cDNA cloning, expression, and characterization of novel recombinant protein / S. V. Markova, L. P. Burakova, L. A. Frank, S. Golz, K. A. Korostilevaa, E. S. Vysotski // *Photochemical & Photobiological Sciences.* — 2010. — Vol. 9. — P. 757-765.
19. Komel, T. Expression of GFP and DsRed fluorescent proteins after gene electrotransfer of tumour cells in vitro / T. Komel, M. Bosnjak, G. Sersa, M. Cemazar // *Bioelectrochemistry.* – 2023. – Vol. 153. – P. 108490.
20. Лапкина, Е.З. Эффективность трансфекции липосомальными носителями gfp-плазмиды в клетках меланомы В16 и модели меланомы in vivo / Е.З. Лапкина, А.Р. Есимбекова, Н.В. Палкина // *Вестник Биомедицина и Социология.* — 2022. — Т. 7, № 3. — С. 19-23.
21. Tsien, R. Y. The green fluorescent protein // *Annu Rev Biochem.* —1998. — Vol. 67. — P. 509-544.
22. Burakova, L. P. Bioluminescent detection probe for tick-borne encephalitis virus immunoassay / L. P. Burakova, A. N. Kudryavtsev, G. A. Stepanyuk, I. K. Baykov, et al. // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2015. — Vol. 407, Iss. 18. — P. 5417–5423.
23. Байков, И.К. Анализ доменной специфичности протективного химерного антитела ch14D5a против гликопротеина E вируса клещевого энцефалита / Байков И.К., Емельянова Л.А., Соколова Л.М., Карелина Е.М. и др. // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* — 2018. — Т. 22, №4. — С. 459-467.

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
М. В. Волва С.Г. Волва
«20» июня 2024

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 — Биология

Получение и изучение свойств гибридного белка, включающего мини-антитело
14D5a против ВКЭ и зеленый флуоресцентный
белок *Clytia gregaria* (cgreGFP-14D5a)

Руководитель

Л.А.
подпись, дата

д.б.н., профессор
ученая степень, должность

Л.А. Франк
Инициалы, фамилия

Научный консультант

Е.Е.
подпись, дата

Е.Е. Башмакова
Инициалы, фамилия

Выпускник

Д.С. 13.06.24
подпись, дата

Д.С. Перетяпкина
Инициалы, фамилия

Красноярск 2024