

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 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 Биология

Химерные белки на основе рекомбинантных  $Ca^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов  
акворина и митрокомина: конструирование, получение и свойства

Руководитель

\_\_\_\_\_

подпись, дата

доцент, к.б.н.

\_\_\_\_\_

должность, ученая степень

Л. П. Буракова

\_\_\_\_\_

инициалы, фамилия

Выпускник

\_\_\_\_\_

подпись, дата

О. В. Коновалова

\_\_\_\_\_

инициалы, фамилия

Красноярск 2024

## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Химерные белки на основе рекомбинантных  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов акворина и митрокомина: конструирование, получение и свойства» содержит 59 страниц текстового документа, 13 иллюстраций, 4 таблицы, 4 приложения и 42 использованных источника.

Ключевые слова: АКВОРИН, МИТРОКОМИН, ФОТОПРОТЕИН, ХИМЕРНЫЙ БЕЛОК, БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, EF-HAND.

Цель работы: получить химерные фотопротеины, на основе акворина и митрокомина, и проанализировать их свойства.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить четыре группы химерных белков (с заменой I EF-hand, с заменой IV EF-hand, с заменой I и IV EF-hands, с заменой II EF-hand);
2. Сделать штаммы-продуценты апобелков на основе BL21 (DE3) Codon Plus (RIPL) *E. coli*;
3. Подобрать условия экспрессии генов целевых белков и получить апобелки высокой степени очистки;
4. Подобрать условия активации апобелков *in vitro*;
5. Получить фотопротеиновые комплексы;
6. Проанализировать и сравнить свойства новых белков со свойствами фотопротеинов дикого типа.

$\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые фотопротеины широко используются в качестве маркерных молекул *in vitro* и *in vivo*. Однако имеющиеся в наличии фотопротеины не обеспечивают весь спектр запросов, предъявляемых к маркерным молекулам. Поэтому дизайн биолюминесцентных белков является актуальной задачей. Также анализ свойств модифицированных белков позволяет устанавливать связь между их структурой и функциями, что относится к базовым вопросам фундаментальной биологии.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	8
1.1. Общие представления о биолюминесценции и ее применении .....	8
1.2. Белки семейства EF-hand и их особенности .....	9
1.3. Ca <sup>2+</sup> -регулируемые фотопротеины гидромедуз .....	11
1.4. Акворин и его свойства.....	13
1.5. Митрокомин и его свойства .....	14
1.6. Химерные белки, их получение и применение .....	15
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	18
2.1. Приборы и реактивы .....	18
2.2. Молекулярное клонирование .....	19
2.2.1. Подготовка вектора и вставок для клонирования.....	19
2.2.2. Препаративное выделение фрагментов ДНК из геля .....	21
2.2.3. Создание экспрессионных конструкций.....	21
2.2.4. Получение компетентных клеток <i>E. coli</i> штамм XL1Blue.....	21
2.2.5. Трансформация <i>E. coli</i> XL1Blue лигазной смесью .....	22
2.2.6. Анализ клонов на наличие вставок .....	22
2.2.7. Выделение плазмидной ДНК.....	22
2.3. Получение активного белка.....	23
2.3.1. Получение экспрессионных штаммов <i>E. coli</i> .....	23
2.3.2. Выделение и очистка белка.....	24
2.3.3. Измерение биолюминесцентной активности .....	24
2.3.4. Измерение чувствительности к Ca <sup>2+</sup> .....	25

2.3.5. Определение оптимальных условий активации.....	26
2.4. Анализ свойств фотопротеинов .....	26
2.4.1. Определение выхода активного белка .....	26
2.4.2. Определение константы спада биолюминесценции.....	27
2.4.3. Измерение спектров .....	27
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	29
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	50
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	51
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	52
ПРИЛОЖЕНИЕ А .....	56
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	57
ПРИЛОЖЕНИЕ В .....	58
ПРИЛОЖЕНИЕ Г.....	59

## ВВЕДЕНИЕ

Биолюминесценция – это способность живых организмов излучать видимый свет, самостоятельно, в специализированных органах – фотофорах, или благодаря бактериальным симбионтам. Она широко распространена в природе, встречается во многих таксонах, но наибольшее число организмов, генерирующих свет, зафиксировано в морских глубинах. Биолюминесценция выполняет множество функций, от защитной до коммуникативной и является, для некоторых видов, частью брачного поведения [1]. Свечение возникает как продукт биохимической реакции, при которой происходит окисление молекулы специфического субстрата (люциферина), катализируемого специфическим ферментом (люциферазой) [2].

Биолюминесцентные белки можно условно разделить на две группы, по типу протекающей реакции, одна из которых включает в себя люциферазы, которые действуют подобно классическим ферментам, а другая – «предварительно заряженные» фотопротеины. Вторая группа белков способна образовывать с субстратом стабильный комплекс, в котором биолюминесцентная реакция запускается либо ионами, либо активными формами кислорода, что зависит от конкретного типа фотопротеина. Наиболее известными и в достаточной степени изученными являются  $Ca^{2+}$ -регулируемые фотопротеины, отвечающие за свечение морских гидромедуз: акворин из *Aequorea victoria*, *A. coerulea* и *A. macrodactyla*, митрокомин из *Mitrocoma cellularia*, клитин из *Clytia gregaria* и *C. hemisphaerica* и обелин из *Obelia longissima* и *O. geniculata* [3].

На сегодняшний день реакции биолюминесценции рассматриваются исследователями как перспективный аналитический инструмент. Фотопротеины всесторонне изучаются в отношении их биохимических свойств, механизма биолюминесценции и т.д. Эти знания служат основой для

разработки уникальных биолюминесцентных систем обнаружения, которые являются «автономными» и высокочувствительными [4].

Из-за расширения сфер применения появилась потребность в модификации фотопротеинов под конкретные цели. Например, фотопротеины используют как индикаторы внутриклеточного кальция, необходимые для биомедицинских исследований и исследований в области фармакологии при разработке новых лекарственных препаратов. Наиболее используемый для этого акворин имеет относительно низкий квантовый выход и быструю кинетику реакции. Фотопротеины, способные излучать более яркий световой сигнал в течение более длительного периода времени, могут увеличить чувствительность и полезность биолюминесцентных белков при высокопроизводительном скрининге (HTS). По этой причине был разработан новый  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый фотопротеин – Photina®, который работает аналогично акворину, но выделяет значительно больше света [5].

Биолюминесцентные метки по чувствительности и специфичности не уступают радиоактивным, но при этом безопасны и не требуют специальных средств защиты.  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые фотопротеины легко переносят химические модификации и гибридизацию с другими белками и аптамерами и, как уже было отмечено, успешно зарекомендовали себя для эффективного детектирования внутриклеточного кальция. Цветные мутанты этих белков позволяют анализировать одновременно сразу несколько компонентов. Поэтому дизайн биолюминесцентных белков, позволяющий расширить области их применения и пополнить пул таких молекул, является актуальной задачей.

Цель работы: получить химерные фотопротеины на основе акворина и митрокомина, и проанализировать их свойства.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи: получить четыре группы химерных белков (с заменой I EF-hand – AVI-MCII-IV и MCI-AVII-IV, с заменой IV EF-hand – AVI-III-MCIV и MCI-III-AVIV, с заменой I и IV EF-hands – AVI-MCII-III-AVIV и MCI-AVII-III-MCIV, с заменой II EF-hand – AVI-MCII-AVIII-IV и MCI-AVII-MCIII-IV); сделать

штаммы-продуценты апобелков на основе BL21 (DE3) Codon Plus (RIPL) *E. coli*; подобрать условия экспрессии генов целевых белков и получить апобелки высокой степени очистки; подобрать условия активации апобелков *in vitro*; получить фотопротеиновые комплексы; проанализировать и сравнить свойства новых белков со свойствами фотопротеинов дикого типа.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Общие представления о биолюминесценции и ее применении

Биолюминесценция, как способность живых организмов к свечению, является широко распространенным явлением в природе. Наибольшее распространение она получила у животных, обитающих в глубинах мирового океана. Свет генерируется в результате биохимической реакции, при которой молекула субстрата окисляется молекулярным кислородом при участии фермента [1].

Существует два основных типа биолюминесцентной реакции – люциферазная и фотопротеиновая. Люциферазный тип реакции представляет собой прямое окисление субстрата (люциферина), приводящее к образованию возбужденного оксилуциферина, который релаксирует в основное состояние с излучением квантов света. Фотопротеины же способны образовывать с предокисленным субстратом устойчивый фотопротеиновый фермент-субстратный комплекс, в котором реакция окисления инициируется внешним фактором, зависящим от типа фотопротеина. Наиболее известными являются  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые фотопротеины, которые отвечают за свечение кишечнорастворимых. В данном случае реакция биолюминесценции инициируется в ответ на связывание ионов кальция с тремя  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающими сайтами на поверхности белковой молекулы. Связывание  $\text{Ca}^{2+}$  вызывает конформационные изменения в субстрат-связывающей полости белка, которые нарушают водородные связи, стабилизирующие 2-гидропероксицелентеразин, чем вызывают реакцию окислительного декарбоксилирования, приводящую к образованию целентерамида в возбужденном состоянии, переход которого в основное состояние сопровождается выделением энергии, часть которой генерируется в виде квантов света в диапазоне 460-500 нм, который варьируется в зависимости от типа фотопротеина [6].

Для протекания фотопротеиновой биолюминесцентной реакции наличие кислорода не является обязательным условием, поскольку он уже связан с белком в форме пероксипроизводного целентеразина. Отсутствие этой зависимости является одним из основных отличий фотопротеиновой реакции биолюминесценции от других реакций, катализируемых люциферазами [7].

Большая часть биолюминесценции эволюционировала в открытом океане, что повлияло на длину волны излучаемого организмами света. Большинство видов генерируют свет в сине-зеленой области спектра, с максимумом длины волны, который проходит дальше всего через морскую воду ( $\lambda_{\max} \sim 460-490$  нм). Зеленый является следующим по распространенности цветом и, в основном, встречается у бентических и мелких прибрежных видов. Возможно потому, что повышенная мутность, создаваемая водными частицами, рассеивает синий свет и способствует прохождению более длинных волн. Фиолетовый, желтый, оранжевый и красный встречаются крайне редко, и в большинстве этих случаев их функции и химический состав остаются неизученными [2].

## **1.2. Белки семейства EF-hand и их особенности**

Термин «EF-hand» был введен Р. Х. Крецингером для обозначения специфического  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего варианта мотива спираль-петля-спираль, впервые обнаруженного в структуре парвальбумина в 1973 году [8]. Затем мотивы EF-hand были последовательно идентифицированы в аминокислотных последовательностях тропонина С [9], легких цепей миозина [10], кальмодулина [11] и во многих других  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белках [12, 13].

В суперсемейство входит около 66 подсемейств и на сегодняшний день, в базе данных UniProt числится более 3000 белков со структурой EF-hand, выполняющие в клетках самые разнообразные функции, начиная от регуляции клетки во время митоза и заканчивая ее апоптотической гибелью. Кальций связывается с EF-hand доменом и белок переводит этот регуляторный сигнал в конкретные для каждого белка функциональные ответы [14].

Как уже упоминалось, мотив формирует петля, ответственная за связывание двухвалентных ионов металлов, и фланкирующих  $\alpha$ -спиралей. Структура мотива подобна направленному вверх указательному пальцу (E-спираль), свернутому к ладони среднему пальцу (петля) и выставленному большому пальцу (F-спираль) правой руки.

Кальций координируется в пентагональной бипирамидальной конфигурации с атомами кислорода через несколько остатков в области петли. Консенсусная петля занимает 12 аминокислотных остатков, шесть из которых участвуют в связывании кальция и находятся в положениях 1, 3, 5, 7, 9 и 12 на петле, с неизменным глутаматом или аспартатом в положении двенадцать. Эта кислота обеспечивает два кислородных лиганда для связывания. Остальные позиции – 1, 3, 5, 7 и 9, варьируются в зависимости от конкретного EF-hand, но также обеспечивают оксигены для связывания [15].

Для белков семейства характерна организация EF-hands в группы. Предполагается, что объединение сайтов стабилизирует конформацию белка, увеличивает сродство каждого сайта к двухвалентным ионам металлов, по сравнению с изолированными сайтами, и обеспечивает кооперативность в связывании, что является критически важным для функционирования. Не существует ни одного известного EF-hand кальций-связывающего белка только с одной EF-hand структурой. Например, парвальбумин имеет три EF-hand мотива, которые образуют структурный домен, хотя функциональными являются только два из них [16]. Кальций-регулируемые фотопротеины гидромедуз имеют четыре EF-hand, объединенных в глобулярную структуру, но II EF-hand эволюционно утратил свою способность к связыванию ионов. Домены не способные к связыванию демонстрируют большую вариативность в последовательности, чем кальций связывающие [17].

Одним из примеров EF-hand-содержащих белков является тропонин, отвечающий за управление процессом сокращения мышечных волокон. Как известно, мышечное сокращение представляет собой относительное скольжение взаимопараллельных миозиновых и актиновых филаментов и

контролируется двумя актин-ассоциированными белками тропонином и тропомиозином. Тропонин содержит три субъединицы: тропонин Т, связывающий тропониновый комплекс с тропомиозином, тропонин I, ингибирующий АТФазную активность актомиозина, и тропонин С, связывающий ионы  $\text{Ca}^{2+}$ . Связывание кальция с С-субъединицей вызывает значительные конформационные изменения в белке, которые изменяют белок-белковые взаимодействия в других белках тонкой нити (I, Т, тропомиозине и актине), что приводит к сократительному процессу. Каждая молекула тропонина С связывает по четыре иона кальция, имея два низкоаффинных  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих сайта и два высокоаффинных, которые также могут связывать и ионы  $\text{Mg}^{2+}$  [18].

Так, семейство EF-hand можно условно разделить на два подсемейства: сигнальные EF-hand белки и сенсорные EF-hand белки. Сигнальные белки претерпевают значительные конформационные изменения после связывания кальция, к ним относятся такие белки, как тропонин. Сенсорные белки реагируют на изменения окружающей среды и претерпевают гораздо меньшие конформационные изменения. К сенсорной группе относятся  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые фотопротеины.

Хотя кальций является традиционным, и, как правило, самым мощным лигандом, запускающим реакцию биолюминесценции, альтернативные двух- и трехвалентные катионы также могут связываться с  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим сайтом и стимулировать люминесценцию. К видам, способным к такой перекрестной реактивности, относят:  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и некоторые лантаниды. Предполагается, что на специфичность кальций-связывающих сайтов фотопротеинов, акворина дикого типа, в частности, влияют консервативные цистеиновые остатки в положениях 145, 152 и 180 [15].

### **1.3. $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые фотопротеины гидромедуз**

Все исследованные  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые фотопротеины медуз класса Hydrozoa представляют собой внутриклеточные односубъединичные белки массой  $\sim 22\text{--}25$  кДа, имеющие в своем составе три функциональных EF-hand  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих участка. Кинетика биолюминесцентной реакции этих фотопротеинов очень быстрая, а ее интенсивность и скорость спада зависят от концентрации кальция, так как эти белки обладают чувствительностью к двухвалентным ионам металлов. Благодаря этому свойству,  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые фотопротеины успешно используются в качестве индикаторов кальция. Эти белки обладают невысокой термостабильностью, но их температурный оптимум активности довольно широкий  $\sim 14\text{--}25$  °C [6].

К настоящему времени клонированы гены таких фотопротеинов гидромедуз, как акворин из *Aequorea victoria*, два варианта обелина из *Obelia longissima* и *Obelia geniculata*, митрокомин из *Mitrocoma cellularia* и клитин из *Clytia gregaria* [19, 20, 21, 22, 23]. Эти фотопротеины получены в рекомбинантном виде, а механизм их биолюминесцентной реакции изучен в достаточной степени. В качестве субстрата они используют целентеразин, который координируется в субстрат-связывающей полости в виде 2-гидропероксицелентеразина тремя каталитическими триадами [24]. Несмотря на относительно высокую гомологию их аминокислотных последовательностей, фотопротеины отличаются между собой по квантовому выходу и кинетике биолюминесцентной реакции, а также по максимумам спектров излучения [25, 26]. Такие фотопротеины, как акворин, митрокомин и клитин, представлены в организмах в нескольких изоформах [27]. Для большинства из них решены пространственные структуры в различных конформационных состояниях [28, 29, 30]. Как показывают исследования, все они представляют собой компактную глобулу из двух доменов. Каждый домен содержит два EF-hand мотива и может быть представлен в форме «чашек», соединенных друг с другом краями, внутренняя полость которых выстлана боковыми цепями гидрофобных аминокислот. Эти «чашки» формируют гидрофобную полость, в которой находится 2-гидропероксицелентеразин,

защищая его от действия растворителя. Подобная защита субстрата обеспечивает эффективность образования целентерамида в возбужденном состоянии с последующей его реализацией в виде квантов света. Боковые цепи гидрофобных остатков, которые формируют целентеразин-связывающую полость, находятся во всех восьми  $\alpha$ -спиралях белка [31]. С помощью направленного мутагенеза были получены различные мутантные варианты с измененными спектрами биолюминесценции и чувствительностью к ионам кальция [32]. Также показана возможность использования фотопротеинов этой группы в качестве маркерных молекул как для анализа *in vitro*, так и на клеточных линиях, в том числе и для индикации внутриклеточного кальция [33].

#### **1.4. Акворин и его свойства**

Наиболее изученным и используемым фотопротеином является акворин из медузы *Aequorea victoria*. Он является первым фотопротеином, полученным в рекомбинантном виде. Молекула рекомбинантного апо-акворина содержит 191 аминокислотный остаток, а его связывание с целентеразином *in vitro* происходит при физиологических условиях, в результате чего образуется устойчивый фотопротеиновый комплекс. Максимум спектра биолюминесценции этого фотопротеина наблюдается при 470 нм [25].

Некоторые аминокислотные остатки критически важны для инициации и развития биолюминесценции, например, мутант акворина с заменой Trp на Phe (W86F) имел бимодальный спектр излучения с максимумами при 455 и 400 нм. Исходя из чего было предположено, что Trp86 принимает участие в образовании эмиттера биолюминесцентной реакции, находится непосредственно в окружении молекулы целентеразина и стабилизирует фенолят-анион. Значение остатков гистидина для биолюминесценции фотопротеинов было также продемонстрировано с помощью сайт-направленного мутагенеза и химических модификаций. Так было показано, что

замена His169 на Ala, Trp и Phe приводит к полной потере активности акворина, тогда как мутанты с модификациями оставшихся четырех гистидинов сохраняют биолюминесцентную активность [6, 34].

Акворин наиболее чувствителен к ионам кальция, по сравнению с другими фотопротеинами гидромедуз. Предельной концентрацией обнаружения ионов кальция акворином является около 24 нМ, а при концентрациях  $10^{-4}$ - $10^{-3}$ М можно зарегистрировать сильный и постоянный биолюминесцентный сигнал [33]. Квантовый выход акворина составляет  $5,12 \times 10^{15}$  кв/мг [25].

$Ca^{2+}$ -связывающие сайты  $Ca^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов могут присоединять не только катионы кальция, но и катионы магния. Конкуренция со стороны магния снижает аффинность  $Ca^{2+}$ -связывающих сайтов. Влияние ионов магния на инициацию биолюминесцентной реакции у акворина выражено более сильно, чем у других  $Ca^{2+}$ -регулируемых белков. Физиологическая концентрация (1мМ)  $Mg^{2+}$  в растворе приводит к увеличению предельной концентрации обнаружения  $Ca^{2+}$  для акворина почти в два раза [33].

### **1.5. Митрокомин и его свойства**

Молекула митрокомина, также как и акворина, представляет собой глобулярную структуру, состоящую из двух доменов, и содержит 198 аминокислотных остатков. Максимум спектра биолюминесценции митрокомина наблюдается при 474 нм [25]. При этом митрокомин наделен важным отличием от других белков, выделенных из гидромедуз. На его С-конце находится остаток тирозина, в то время как у других фотопротеинов находится остаток пролина. Пролин отвечает за стабильность глобулы белка, поскольку было установлено, что его удаление или замена приводят к снижению биолюминесцентной активности [20]. Было высказано предположение, что этот аминокислотный остаток взаимодействует через водородную связь с N-концевым доменом в формировании закрытой

конформации фотопротеина. Такая конформация, как уже было отмечено, изолирует субстрат – 2-гидропероксицелентеразин, расположенный в пределах фотопротеиновой глобулы, от растворителя и способствует высокому квантовому выходу биолюминесценции [21]. Квантовый выход митрокомина при этом равен  $6,28 \times 10^{15}$  кв/мг [22, 25]. Кроме того, апо-митрокомин более, чем другие фотопротеины гидромедуз, склонен к образованию агрегатов, что затрудняет его активацию *in vitro*.

Митрокомин менее чувствителен к  $\text{Ca}^{2+}$ , чем акворин. Его предельная концентрация обнаружения кальция примерно в 3-5 раз выше, по сравнению с акворином, но магний почти не оказывает на нее влияния [33].

### **1.6. Химерные белки, их получение и применение**

Методы генной инженерии позволяют создать гены, кодирующие химерные белки, объединяющие в себе целевой белок и дополнительный полипептид. Такое слияние производится с помощью лигирования кодирующих участков соответствующих генов. Экспрессия такого химерного гена приводит к синтезу белка (фьюжн-белка), который может сочетать в себе некоторые функциональные свойства обоих исходных белков.

Гены, изолированные из различных источников, подвергаются рестрикции, для получения интересующих фрагментов нуклеотидной последовательности, и в последствии вводятся в одну экспрессионную векторную систему.

Создание подобных слитых конструкций широко используется для контроля за переносом чужеродного гена и уровнем его экспрессии. Если это необходимо, то для выявления временных или пространственных особенностей экспрессии этого гена, а также для определения локализации его продукта в клетке-хозяине. В данном случае последовательность гена-мишени сливают с репортерным геном, активность которого в норме не наблюдается, из-за чего его наличие может быть легко детектировано. Чаще всего в качестве

репортерных используют гены фотопротеинов, зеленого флуоресцентного белка (GFP), люциферазы, бета-галактозидазы и т.д.

Зеленый флуоресцентный белок интересен тем, что способен флуоресцировать в видимой (зеленой) области спектра при облучении длинноволновым УФ, без субстратов или кофакторов, что обусловлено структурой его молекулы.

У акворина высокая скорость ответа на связывание ионов кальция, а максимальная интенсивность реакции достигается за несколько миллисекунд. На основании чувствительности акворина в сочетании с благоприятными свойствами и, казалось бы, удовлетворительной специфичностью было предложено использование люминесценции акворина в качестве индикатора  $Ca^{2+}$  в биологических системах. Но из-за того, что этот фотопроtein имеет невысокий квантовый выход биолюминесцентной реакции (0,23 при 25 °C), исследователи ищут способ его увеличения [35].

Так был разработан гибридный фотопроtein – Photina®. Для создания этой химерной конструкции фрагмент гена обелина, содержащий сайты рестрикции Nde и MunI, расположенные между первыми двумя EF-hand центрами, был заменен на аналогичный фрагмент гена клитина. Обелин обладает отличным от акворина спектром биолюминесценции, но его низкий уровень светового излучения ограничивает достижимую чувствительность, что является основным недостатком для применения к HTS. Было предположено, что сила сигнала может быть улучшена, если включить в обелин ключевые области из клитина.

Для создания конструкции фрагмент гена обелина был клонирован в вектор pCR®-Blunt (Invitrogen). Чтобы не нарушать три EF-hand структуры обелина, был идентифицирован наименее консервативный участок и заменен на соответствующий участок гена клитина, не вовлекающий эти структуры. В результате, были синтезированы четыре олигонуклеотида, охватывающие область клитина от нуклеотидов 156 до 291, и использованы для создания фрагмента, который был клонирован по сайтам Nde и MunI последовательности

обелина. Затем кодирующую последовательность субклонировали в вектор экспрессии pcDNA3 (Invitrogen).

Эта химера имела подходящую интенсивность и продолжительность люминесценции. У нового фотопротеина слабее уровень шума, чем у зеленого флуоресцентного белка, и стабильно более сильный сигнал, чем у акворина, при тестировании в эквивалентных условиях. Эта разработка открыла новые возможности для применения фотопротеинов для создания клеточных анализов HTS [5].

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Приборы и реактивы

В работе был использован вектор pET22b (Novagen, США). Для ПЦР использовались: ДНК-полимераза Tersus и Tersus Plus буфер x10 (Евроген, Россия), смесь dNTP (SibEnzyme, Россия). При очистке ПЦР-продуктов использовался набор – QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, США). Для проведения рестрикции были использованы: Y-Buffer x10, BSA (SibEnzyme, Россия) и эндонуклеазы рестрикции - FauNDI, AsuNHI, FriOI, HindIII (SibEnzyme, Россия), XhoI (NEB, Великобритания). Для выделения фрагментов ДНК из геля использовался набор – QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, США). Для лигирования ДНК с вектором использовали T4 ДНК-лигазный буфер x10, T4 ДНК-лигазу (SibEnzyme, Россия). В качестве клеток-хозяев использовали бактериальные штаммы *E. coli* XLIBLue и BL21(DE3) CodonPlus (RIPL) (Stratagene, США). LB-среда, ампициллин, изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (Thermo Scientific, США). Для выделения плазмидной ДНК был использован набор Plasmid Miniprep (Евроген, Россия). Целентеразин высокой степени чистоты от NanoLight Technology Prolume Ltd. (США). Измерения световой эмиссии проводили с помощью биолуминометра БЛМ-8812 (СКТБ «Наука», Красноярск, Россия).

Также, при работе использовалось оборудование: миксер Vortex-Genie2 (Scientific Industries, США), амплификатор MJ Mini (Bio-Rad, США), амплификатор ProFlex (Thermo Fisher Scientific, США), микроцентрифуга Centrifuge 5415G (Eppendorf, Германия), центрифуга Avanti J-E (Beckman Coulter, США), прибор для электрофореза в агарозном геле (Bio-Rad, США), термостат суховоздушный KB 23 (Binder, Германия), водяная баня Stirred water bath WB-4MS (BioSan, Латвия), трансиллюминатор Dual-intensity Transilluminator (UVP, США). Для дизайна генов химерных фотопротеинов использовали программу Gene Runner. Цифровые изображения агарозных и

полиакриламидных гелей обрабатывали в пакете программ Alpha Ease v5.5 системы MultiImage Light Cabinet (Alpha Innotech Corp., США). Шейкер-инкубатор Excella E25 (New Brunswick Scientific, США). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре SmartSpec Plus (Bio-Rad, США), ультразвуковой дезинтегратор УЗДН-2Т (У-РосПрибор, Россия), хроматографические колонки HiTrap DEAE FF, HiTrap QHP5, HiTrap Desalting, Capto HiRes 5/50 (GE Healthcare, США). Очистку белков проводили с помощью хроматографических систем BioLogic LP (Bio-Rad, США) и Akta Pure (GE Healthcare, США). Построение графиков проводили в программе SigmaPlot.

## 2.2. Молекулярное клонирование

### 2.2.1. Подготовка вектора и вставок для клонирования

Нуклеотидные последовательности, содержащие фрагменты кодирующей части генов акворина или митрокомина с сайтами для рестрикции FauNDI, AsuNHI, HindIII, FriOI и XhoI были получены с помощью ПЦР Tersus-полимеразой. В качестве матриц использовали плазмиды pET22b-AV7 и pET22b-MS2 с концентрацией 5 нг/мкл.

Для синтеза фрагментов AVI и MSII, для получения конструкции AVI-MSII-AVIII-IV, была использована матрица с удаленным HindIII сайтом рестрикции с помощью сайт-направленного мутагенеза.

Аmplификацию проводили с использованием специфических праймеров (Таблица 1).

Таблица 1 - Праймеры, использованные в ПЦР

Фрагмент	Название праймера	Нуклеотидная последовательность
AVI	37T7pr	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
	72AV45sI-Bm3	5'-TTGTTTCAGGGCTAGCTCCAAGAT-3'

AVII	71AV45tII-III-Bm5 787AVII-Hi3	5'-ATCTTGGAGCTAGCCCTGAACAA-3' 5'-GAAGCAAGCTTTTTCCATCCTTCG-3'
AVI-III	37T7pr 70AV45sI-II-Fr3	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' 5'-CGATTGGATGAGCCCAGCAGA-3'
AVII-IV	71AV45tII-III-Bm5 38T7Ter	5'-ATCTTGGAGCTAGCCCTGAACAA-3' 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
AVIII-IV	786AVIII-IV-Hi5 38T7Ter	5'-GAAAAAGCTTGCTTCCGAGGAATTG-3' 5'- GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
AVIV	69AV45tIII-Fr5 38T7ter	5'-TCTGCTGGGCTCATCCAATCG -3' 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
MCI	37T7pr 64HMsl-Bm3	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' 5'-GTTCTTCGCTAGCTCCAAGTTTCTT-3'
MCII	63HMtII-III-Bm5 785MCII-Hi3	5'-AAGAACTTGGAGCTAGCGAAGAAC-3' 5'-CAATTCAAGCTTAGCCAACCTCTTC-3'
MCI-III	37T7pr 74HMsl-II-Fr3	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' 5'-CTGTTGGAGCCCAGCACAATGA-3'
MCII-III	63HMtII-III-Bm5 74HMsl-II-Fr3	5'-AAGAACTTGGAGCTAGCGAAGAAC-3' 5'-CTGTTGGAGCCCAGCACAATGA-3'
MCII-IV	63HMtII-III-Bm5 38T7ter	5'-AAGAACTTGGAGCTAGCGAAGAAC-3' 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
MCIII-IV	784MCIII-IVHi5 38HM-Xh3	5'-TGGCTAAGCTTGAATTGGAAAGG-3' 5'-TATAACTCGAGTTAATAAGGTACAGCACC-3'
MCIV	73HMtIII-Fr5 38HM-Xh3	5'-TCATTGTGCTGGGCTCCAACAG-3' 5'-TATAACTCGAGTTAATAAGGTACAGCACC-3'

Программа амплификации:

95°C – 1 мин

95°C – 20 с

56°C – 30 с

} 25 ЦИКЛОВ

72°C – 1 мин

72°C – 4 мин

ПЦР-продукты были очищены с помощью набора QIAquick PCR Purification Kit в соответствии с протоколом производителя. Затем, каждый фрагмент ДНК был обработан двумя рестриктазами: AVI и MCI – FauNDI и AsuNHI, AVII и MCII – AsuNHI и HindIII, AVI-III и MCI-III – FauNDI и FriOI, MCII-III – AsuNHI и FriOI, AVII-IV и MCII-IV – AsuNHI и XhoI, AVIII-IV и MCIII-IV – HindIII и XhoI, AVIV и MCIV – FriOI и XhoI. Плазмида pET22b была рестрицирована FauNDI и XhoI с последующим дефосфорилированием щелочной фосфатазой.

### **2.2.2. Препаративное выделение фрагментов ДНК из геля**

Вектор pET22b и фрагменты после рестрикции были очищены с помощью препаративного электрофореза в 1%-агарозном геле. ДНК из геля выделяли с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit по протоколу производителя.

### **2.2.3. Создание экспрессионных конструкций**

Лигирование вставок с вектором pET22b проводили с помощью фермента T4 ДНК-лигазы при 16°C в течение ночи. Состав лигазной смеси: ДНК вектора и вставок, T4 ДНК-лигазный буфер, T4 ДНК-лигаза. Инактивацию лигазы проводили в течение 10 минут при 72°C.

### **2.2.4. Получение компетентных клеток *E. coli* штамм XL1Blue**

Культуру клеток выращивали в среде LB без антибиотика до  $OD_{600} = 0,6 - 0,8$ . Клетки охлаждали на льду в течение 10 мин и центрифугировали при 3000g в течение 10 мин при 4°C. Осадок ресуспендировали в ледяном буфере (20 mM CaCl<sub>2</sub>, 80 mM MgCl<sub>2</sub>) и инкубировали на льду в течение 30 мин. Далее клетки осаждали центрифугированием при 3000g в течение 10 мин при 4°C, осадок

ресуспендировали в ледяном буфере (100 мМ CaCl<sub>2</sub>), к объединенной порции клеток добавляли глицерин до конечной концентрации 20%. Суспензию клеток в объеме по 100 мкл замораживали и хранили при –80°C.

### **2.2.5. Трансформация *E. coli* XL1Blue лигазной смесью**

К 50 мкл компетентных клеток *E. coli* штамм XL1Blue добавляли 5 мкл лигазной смеси, перемешивали и инкубировали на льду в течение 30 мин. Для проведения «теплового шока» клетки помещали на 45 сек в водяную баню (42°C), после быстро переносили в лед и охлаждали на льду 2 мин. Далее к суспензии клеток добавляли 200 мкл SOC среды, инкубировали при 37 °С в течение 1 ч и высевали на чашки с LB агаром, содержащим 200 мкг/мл ампициллина.

### **2.2.6. Анализ клонов на наличие вставок**

Для отбора целевых рекомбинантных клонов после трансформации скрининг бактериальных колоний проводили методом ПЦР. Плазмидную ДНК из колоний выделяли с помощью нагревания клеток в H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> при 95°C в течение 10 минут с последующим центрифугированием при 16 тыс. g в течение 2 минут. Супернатант использовали в качестве матрицы. Для скрининга использовали специфические для рЕТ22b прямой и обратный праймеры T7 promotor и T7 terminator. Вывод о наличии или отсутствии вставки делали по наличию фрагмента ДНК заданного размера. Клоны с правильными вставками использовали для препаративного выделения плазмидной ДНК.

### **2.2.7. Выделение плазмидной ДНК**

Отобранные колонии высевали в 5 мл LB-среды с ампициллином, инкубировали при 37 °С и 220 об/мин в течение ночи. Ночную культуру

использовали для выделения плазмидной ДНК. Выделение проводилось с использованием набора Plasmid Miniprep в соответствии с протоколом производителя. Правильность конструкций была подтверждена секвенированием (ЦКП «Геномика», Новосибирск).

## **2.3. Получение активного белка**

### **2.3.1. Получение экспрессионных штаммов *E. coli***

Для трансформации к 20 мкл компетентных клеток *E. coli* штамм BL21 (DE3) Codon Plus (RIPL) добавляли 1 мкл плазмидной ДНК, перемешивали и инкубировали на льду в течение 30 мин. Для проведения «теплового шока» клетки нагревали до 42°C в течение 25 сек, после быстро переносили в лед и инкубировали на льду 2 мин. Далее к суспензии клеток добавляли 200 мкл SOC среды, инкубировали при 37°C в течение 1 ч и высевали на чашки с LB агаром, содержащим 200 мкг/мл ампициллина. Наращивание биомассы проводили в 100 мл LB-среды с 200 мкг/мл ампициллина при 37°C со встряхиванием (220 об/мин) до достижения плотности культуры  $OD_{600} = 0,6 - 0,8$ . Индукцию синтеза белка осуществляли добавлением ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ, после чего растили еще 3 часа. Уровень экспрессии оценивали с помощью ДСН ПААГ по количеству белка в аликвотах через каждый час инкубации. Клетки осаждали центрифугированием (3000 об/мин, 15 мин). Осадок использовали для выделения апобелков.

Электрофорез в 12,5% полиакриламидном геле проводился по методу Лэммли [36]. Использовали кассету, содержащую разделяющий 12,5% полиакриламидный гель с ДСН. Клеточные осадки уравнивались по оптической плотности лизирующим буфером и подвергались кипячению в течение 3 минут. В качестве маркера молекулярного веса использовали Precision Plus Protein AllBlue Standards (Bio-Rad, США). Окраску геля осуществляли спиртово-

уксусным раствором кумасси ярко-голубого, отмывку – 10% водным раствором уксусной кислоты при 60°C.

### **2.3.2. Выделение и очистка белка**

Клеточный осадок ресуспендировали в пятикратном объеме буфера 20 mM Трис-НСl pH 7,0 и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора четырехкратной обработкой по 20 сек с интервалами по 20 сек на льду. Затем центрифугировали (10000 об/мин, 10 мин), осадок, содержащий тельца включения, промывали, последовательно ресуспендируя в 0,9% NaCl, 1% Тритоне X-100, забуференными 20 mM Трис-НСl pH 7,0, и в 20 mM Трис-НСl pH 7,0, с центрифугированием после каждого этапа (10000 g, 10 мин). Тельца включения растворяли в 6 M растворе мочевины в 20 mM Трис-НСl pH 7,0 и осветляли центрифугированием.

Хроматографическую очистку апобелков проводили с помощью ионообменной хроматографии на колонке HiTrap DEAE FF в линейном градиенте NaCl (0-0,8 M) с использованием буферов (буфер А – 6M Urea в 20 mM Tris-НСl, pH 7,0; буфер В – 1M NaCl в буфере А). Хроматографическую очистку фотопротеиновых комплексов проводили с помощью ионообменной хроматографии на колонке HiTrap QHP5 в линейном градиенте NaCl (0-0,5M) с использованием буферов (буфер А – 20 mM Tris-НСl, pH 7,0, 5 mM ЭДТА; буфер В – 1M NaCl в буфере А). Концентрацию белка определяли по методу Лоури [37] с помощью набора DC Protein assay (Bio-Rad, США) по протоколу производителя.

### **2.3.3. Измерение биолюминесцентной активности**

Биолюминесцентную активность измеряли с помощью биолюминометра БЛМ-8812 путем быстрого внесения 10 мкл смеси в кювету люминометра, содержащую 490 мкл 50 mM Трис-НСl, pH 8,8, 2 mM CaCl<sub>2</sub>. Измерения каждого

из образцов проводили минимум в 3-х повторностях. Сигнал регистрировали до момента его полного угасания.

#### **2.3.4. Измерение чувствительности к $\text{Ca}^{2+}$**

Зависимость биолюминесценции химерного фотопротейна от концентрации кальция определяли с помощью  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA буферов при низких концентрациях кальция (диапазон от  $10^{-8}$  до  $5 \times 10^{-5}$  М) и простым разведением раствора  $\text{CaCl}_2$  при высоких концентрациях кальция (диапазон от  $10^{-6}$  до  $5 \times 10^{-2}$  М) [22]. Кальциевые буферные растворы готовились из двух стоковых растворов путём реципрокного разбавления: один из которых содержал эквимольное количество  $\text{Ca}^{2+}$  и EGTA, другой – точно такое же количество хелатора, но без  $\text{Ca}^{2+}$ . Для определения концентрации кальция в готовых растворах использовали равновесную константу диссоциации хелатора при данных ионной силе, температуре и pH. Для удаления следовых количеств кальция, растворы пропускали через колонку с сорбентом Chelex-100 (Sigma). Для приготовления растворов использовали деионизованную воду (18,2 МОм).

В работе использовали только новую пластиковую посуду, предварительно обработанную EGTA и деионизованной водой, чтобы убрать загрязнение ионами кальция. Во время измерений температура всех растворов и измерительного кюветного блока люминометра поддерживалась на постоянном уровне. Измерения проводились при  $20^\circ\text{C}$ .

Растворы белков очищали от EGTA гель-фильтрацией на колонке HiTrap Desalting в буфере, содержащем 150 мМ KCl, 5 мМ PIPES, pH 7.0. Фракции, содержащие белок, идентифицировали по биолюминесцентной активности. Во избежание загрязнения образца, используемого для определения зависимости биолюминесцентной активности от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , EGTA собирали только самые первые выходящие с колонки белковые фракции. Измерение светового сигнала проводили впрыскиванием 10 мкл таким образом подготовленного раствора фотопротейна в 1 мл раствора, содержащего нужную концентрацию

кальция. Результаты измерений анализировали в координатах  $\log(L/L_{int})$  vs  $\log[Ca^{2+}]$ , где  $L$ , интенсивность светового сигнала,  $L_{int}$ , суммарное количество света, излучённое в ходе реакции, определённое с помощью кинетических измерений в тех же условиях в том же образце белка. Люминометр имел три нейтральных светофильтра разной оптической плотности, ослабляющих излучение, что позволило записать сигналы, отличающиеся по величине на 8 порядков.

### 2.3.5. Определение оптимальных условий активации

Для определения оптимальных условий pH и концентрации NaCl использовали буферы, содержащие 50 mM Бис-Трис-пропан-HCl, 5 mM ЭДТА и 5 mM ДТТ с pH 7-9 и концентрацией NaCl 0-1M. Молярное соотношение белок:целентеразин было 1:5. После добавления всех компонентов образцы оставляли при 4°C. Приведенные значения представляют собой среднее 3-х измерений.

## 2.4. Анализ свойств фотопротеинов

### 2.4.1. Определение выхода активного белка

Для оценки выхода активного белка пользовались формулой 1.

$$A(\%) = \frac{C_{charg}}{C_{charg} + C_{apo}} \times 100\% \quad (1),$$

где  $A$  (%) – выход активного белка (%),  $C_{charg}$  – концентрация белка в хроматографической фракции активного фотопротеина (мг/мл),  $C_{apo}$  – концентрация белка в хроматографической фракции апофотопротеина (мг/мл).

#### 2.4.2. Определение константы спада биолюминесценции

Для определения константы спада биолюминесценции измеряли активность при  $\sim 23$  °С с помощью биолюминометра 8802 МБЕ (СКТБ "Наука", Красноярск, Россия), впрыскивая 10 мкл раствора белка в 20 мМ Трис-НСl рН 7,0, 5 мМ ЭДТА в кювету биолюминометра, содержащую 50 мМ Трис-НСl рН 8,8, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, световой сигнал регистрировали с помощью самописца Res 112 (Amersham Biosciences, США) со скоростью ленты 20 мм/с до полного прекращения эмиссии. Константу спада биолюминесценции рассчитывали по формуле 2.

$$k_d = \frac{\ln 4 \times v}{l}, \quad (2)$$

где  $k_d$  – константа спада биолюминесцентной реакции (с<sup>-1</sup>),  $v$  – скорость ленты (мм/с),  $l$  – расстояние от начала до конца спада светового сигнала.

#### 2.4.3. Измерение спектров

Спектры биолюминесценции и флуоресценции белков записывали на флуоресцентном спектрофотометре «Varian Cary Eclipse» (Agilent, США). С помощью программного обеспечения прибора все спектры были скорректированы на чувствительность ФЭУ к различным длинам волн. Спектры биолюминесценции измеряли в диапазоне от 370 до 600 нм, со скоростью 12000 нм/мин, напряжение на ФЭУ 1000 В. Спектры флуоресценции измеряли при возбуждении 350 нм, в диапазоне от 370 до 600 нм, со скоростью 1200 нм/мин. Напряжение на ФЭУ 600 В. Измерения проводили при ширине щели 5 нм и температуре  $\sim 23$  °С. 100 мкл раствора белка в 20 мМ Трис-НСl рН 7,0, 5 мМ ЭДТА помещали в кювету, содержащую 900 мкл 50 мМ бис-Трис-пропан-НСl рН 7,0. Биолюминесценцию инициировали впрыском 40 мкл 100

мМ раствора  $\text{CaCl}_2$  в 100 мМ Трис-НСl рН 7,0, после чего запись спектров вели до полного прекращения свечения. Сразу после записывали спектры флуоресценции.

#### **2.4.4. Термоинактивация**

Для оценки термостабильности полученных белков образец фотопротеина объемом 200 мкл с концентрацией 0,1 г/л в 20 мМ Трис-НСl рН 7,0, 5 мМ ЭДТА инкубировали в термостате при 37 °С в течение часа, каждые 10 минут измеряя биолюминесцентную активность. Результаты представляли в виде среднего по трем измерениям на графике в линейной системе координат.

## **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ**

Страницы 29-49 изъяты в связи с авторским правом.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из подходов в белковой инженерии является метод направленной модификации, позволяющий получать белки с заданными свойствами. Наиболее успешно его можно применять, если имеется подробная информация о строении и функции используемых белков. Поскольку фотопротеины гидромедуз вообще и акворин с митрокомином в частности относительно хорошо исследованы, то их модификацию легко рассчитать, а ее результат с большой вероятностью будет успешным.

Создание химерных фотопротеинов является перспективным направлением как для исследования фундаментальных свойств тех белков, на основе которых они получены, так и для развития новых аналитических инструментов, где такие молекулы могут выступать в качестве маркерных.

В ходе данной работы получено и охарактеризовано 7 различных вариантов химер. Замены в митрокомине I EF-hand или I и IV одновременно на аквориновые увеличили выход активного белка по сравнению с митрокомином дикого типа. При одновременной замене повысилась удельная биолюминесцентная активность, а при замене I EF-hand повысилась термостабильность фотопротеинового комплекса, что можно отнести к улучшенным свойствам. Это делает такие химеры перспективными для применения в работах с эукариотическими клетками и *in vivo* в качестве маркерных белков.

Таким образом, конструирование химерных белков на основе генов акворина и митрокомина позволит значительно расширить область применения фотопротеинов как биолюминесцентных меток в биотехнологии и биомедицине.

В дальнейшем планируется получить и охарактеризовать другие варианты химерных белков для увеличения возможностей применения молекул такого типа.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ДТТ – дитиотреитол

ИПТГ – изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид

ДСН – додецилсульфат натрия

ПААГ – полиакриламидный гель

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭГТА – этиленгликольтетрауксусная кислота

DEAE – диэтиламиноэтил

LB – Lysogeny Broth

SOC – Super Optimal Broth for Catabolic repression

HTS – высокопроизводительный скрининг

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Haddock S.H., Moline V.A., Case J.F. Bioluminescence in the sea. //Ann. Rev. Mar. Sci. – 2010. – V. 2. – P. 443-493.
2. Widder E.A. Bioluminescence in the ocean: origins of biological, chemical, and ecological diversity //Science. – 2010. – V. 328. – P. 704-708.
3. Shimomura O. Bioluminescence: Chemical Principles and Methods //World Scientific. Singapore. – 2006.
4. Frank L.A. Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins: effective immunoassay reporters //Sensors. – 2010. – V. 10. – P. 11287-11300.
5. Bovolenta S., Foti M., Lohmer S., and Corazza S. Development of a Ca<sup>2+</sup>-Activated Photoprotein, Photina®, and Its Application to High-Throughput Screening //J Biomol Screen. – 2007. – V. 12. – P. 694.
6. Бондарь В.С. и др. Физика и химия биолюминесценции. – 2015.
7. Высоцкий Е.С., Маркова С.В., Франк Л.А. Кальций-регулируемые фотопротеины морских кишечнopolостных //Молекулярная биология. – 2006. – Т. 40. – С. 404-317.
8. Kretsinger R.H., Nockolds C.E. Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. J. Biol. Chem. – 1973. – V. 248. – P. 3313-26.
9. Collins J. H. et al. The amino acid sequence of rabbit skeletal muscle troponin C: Gene replication and homology with calcium-binding proteins from carp and hake muscle //FEBS letters. – 1973. – V. 36. – P. 268-272.
10. Collins J. H. Homology of myosin light chains, troponin-C and parvalbumins deduced from comparison of their amino acid sequences //Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1974. – V. 58. – P. 301-308.
11. Stevens F. C. et al. Comparison of calcium-binding proteins. Bovine heart and brain protein activators of cyclic nucleotide phosphodiesterase and rabbit skeletal muscle troponin C //Journal of biological chemistry. – 1976. – V. 251. – P.

4495-4500.

12. Kawasaki H., Kretsinger R. H. Calcium-binding proteins. 1: EF-hands //Protein profile. – 1994. – V. 1. – P. 343-51.

13. Kawasaki H., Kretsinger R. H. Calcium-binding proteins 1: EF-hands //Protein profile. – 1995. – V. 2. – P. 297-490.

14. Grabarek Z. Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins //Journal of molecular biology. – 2006. – V. 359. – P. 509-525.

15. Rowe L., Ensor M., Daunert S. EF-hand  $\text{Ca}^{2+}$ -binding bioluminescent proteins: effects of mutations and alternative divalent cations //Genetically Engineered and Optical Probes for Biomedical Applications IV. – SPIE, 2007. – V. 6449. – P. 190-197.

16. Nelson M. R., Chazin W. J. Structures of EF-hand  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins: diversity in the organization, packing and response to  $\text{Ca}^{2+}$  binding //Biometals. – 1998. – V. 11. – P. 297-318.

17. Nakayama S., Kretsinger R. H. Evolution of the EF-hand family of proteins //Annual review of biophysics and biomolecular structure. – 1994. – V. 23. – P. 473-507.

18. Sundaralingam M. et al. Molecular structure of troponin C from chicken skeletal muscle at 3Å resolution //Journal of Biosciences. – 1985. – V. 8. – P. 451-460.

19. Inouye S. et al. Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1985. – V. 82. – P. 3154-3158.

20. Illarionov B. A. et al. Sequence of the cDNA encoding the  $\text{Ca}^{2+}$ -activated photoprotein obelin from the hydroid polyp *Obelia longissima* //Gene. – 1995. – V. 153. – P. 273-274.

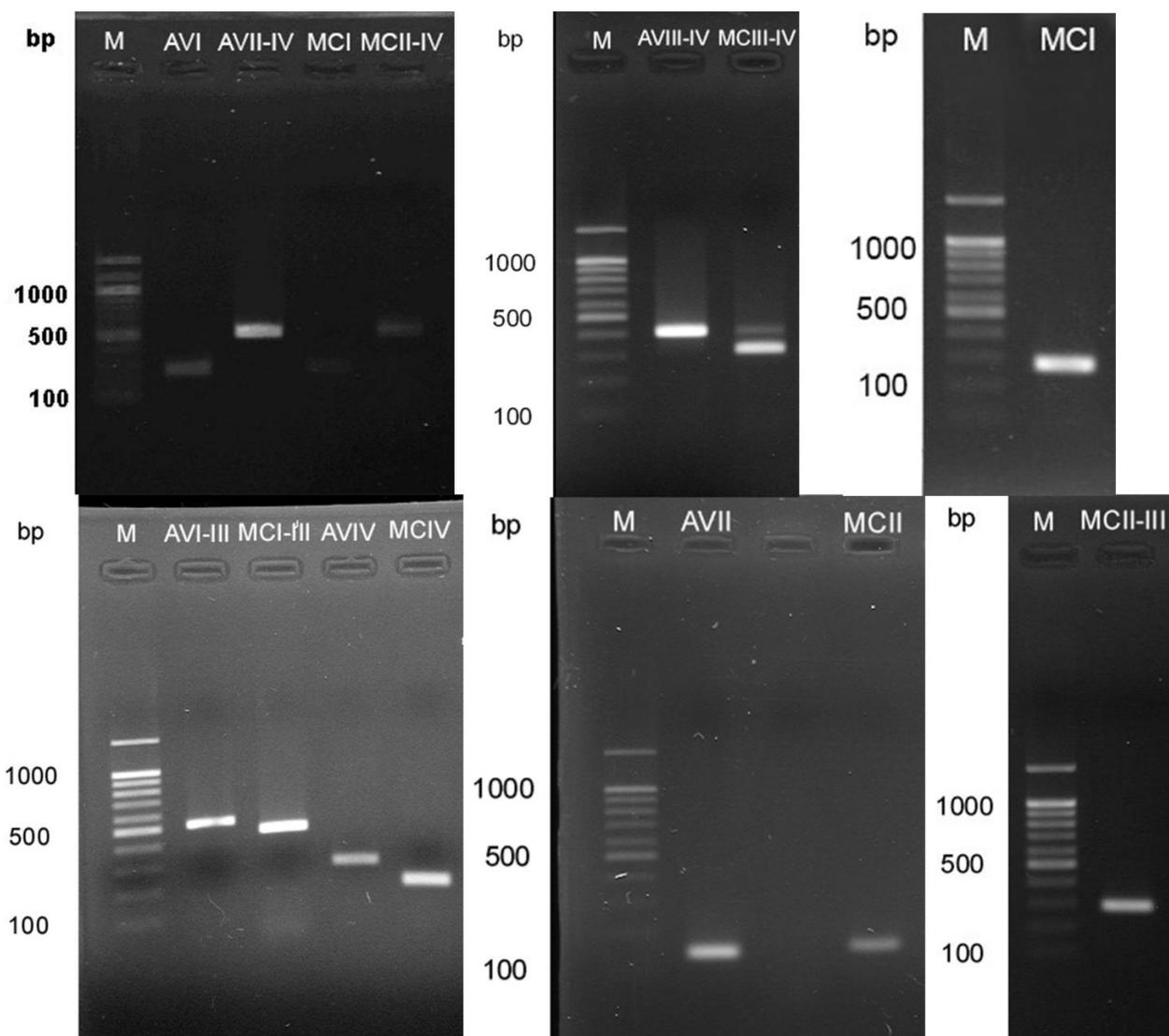
21. Markova S. V. et al. Obelin from the bioluminescent marine hydroid *Obelia geniculata*: cloning, expression, and comparison of some properties with those of other  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated photoproteins //Biochemistry. – 2002. – V. 41. – P. 2227-2236.

22. Fagan T. F. et al. Cloning, expression and sequence analysis of cDNA for the Ca<sup>2+</sup>-binding photoprotein, mitrocomin //FEBS letters. – 1993. – V. 333. – P. 301-305.
23. Inouye S. et al. Cloning and sequence analysis of cDNA for the Ca<sup>2+</sup>-activated photoprotein, clytin //FEBS letters. – 1993. – V. 315. – P. 343-346.
24. Natashin P. V. et al. The Role of Tyr-His-Trp Triad and Water Molecule Near the N1-Atom of 2-Hydroperoxycoelenterazine in Bioluminescence of Hydromedusan Photoproteins: Structural and Mutagenesis Study //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – V. 24. – P. 6869.
25. Malikova N. P. et al. Specific Activities of Hydromedusan Ca<sup>2+</sup>-Regulated Photoproteins //Photochemistry and Photobiology. – 2022. – V. 98. – P. 276-284.
26. Stepanyuk G. A. et al. Interchange of aequorin and obelin bioluminescence color is determined by substitution of one active site residue of each photoprotein //FEBS letters. – 2005. – V. 579. – P. 1008-1014.
27. Shimomura O. Isolation and properties of various molecular forms of aequorin //Biochemical Journal. – 1986. – V. 234. – P. 271-277.
28. Liu Z. J. et al. Crystal structure of obelin after Ca<sup>2+</sup>-triggered bioluminescence suggests neutral coelenteramide as the primary excited state //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – V. 103. – P. 2570-2575.
29. Deng L. et al. Crystal structure of a Ca<sup>2+</sup>-discharged photoprotein: implications for mechanisms of the calcium trigger and bioluminescence //Journal of Biological Chemistry. – 2004. – V. 279. – P. 33647-33652.
30. Deng L. et al. All three Ca<sup>2+</sup>-binding loops of photoproteins bind calcium ions: The crystal structures of calcium-loaded apo-aequorin and apo-obelin //Protein science. – 2005. – V. 14. – P. 663-675.
31. Liu Z. J. et al. Structure of the Ca<sup>2+</sup>-regulated photoprotein obelin at 1.7 Å resolution determined directly from its sulfur substructure //Protein Science. – 2000. – V. 9. – P. 2085-2093.

32. Ereemeeva E. V., Vysotski E. S. Exploring bioluminescence function of the  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated photoproteins with site-directed mutagenesis //Photochemistry and Photobiology. – 2019. – V. 95. – P. 8-23.
33. Malikova N. P. et al. Characterization of hydromedusan  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated photoproteins as a tool for measurement of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration //Analytical and bioanalytical chemistry. – 2014. – V. 406. – P. 5715-5726.
34. Head J.F. et al. The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution //Nature. – 2000. – V. 405. – P. 372-376.
35. Shimomura O., Johnson F. H. Specificity of aequorin luminescence to calcium //NASA. Goddard Space Flight Center Anal. Appl. of Bioluminescence and Chemiluminescence. – 1975.
36. Laemmli U.K., Favre M.J. //Mol. Biol. – 1973. – V. 80 – P. 575–599.
37. Lowry O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent //Journal of biological chemistry. – 1951. – V. 193. – P. 265-275.
38. Tsuji F. I. et al. Molecular evolution of the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding photoproteins of the hydrozoa //Photochemistry and photobiology. – 1995. – V. 62. – P. 657-661.
39. Doi I. et al. Selective protein modification by the hydroperoxide intermediate in a photoprotein, aequorin //Bioorganic & medicinal chemistry. – 2009. – V. 17. – P. 3399-3404.
40. Markova S. V. et al. The light - sensitive photoprotein berovin from the bioluminescent ctenophore *Beroë abyssicola*: a novel type of  $\text{Ca}^{2+}$  - regulated photoprotein //FEBS J. – 2012. – V. 279. – P. 856-870.
41. Shimomura, O. Light-emitters involved in the luminescence of coelenterazine / O. Shimomura, K. Teranishi // Luminescence. – 2000. – V. 15. – P. 51-58.
42. Allen D. G., Blinks J. R., Prendergast F. G. Aequorin luminescence: relation of light emission to calcium concentration — a calcium-independent component //Science. – 1977. – V. 195. – P. 996-998.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

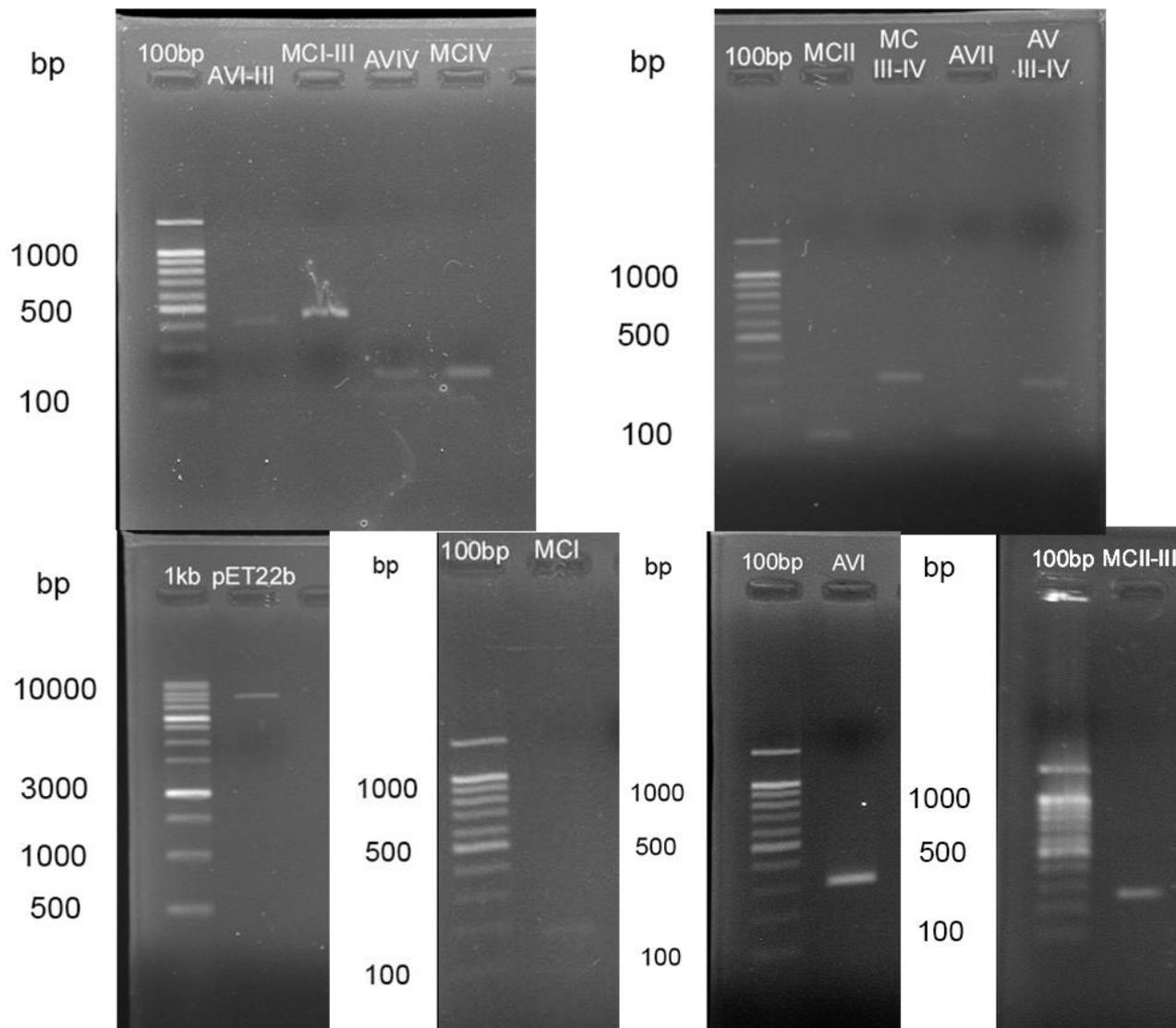
Электрофореграммы ампликонов ДНК-фрагментов генов фотопротеинов



На треках: М – маркер молекулярного веса 100 bp DNA-Ladder (СибЭнзим, Москва, Россия).

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

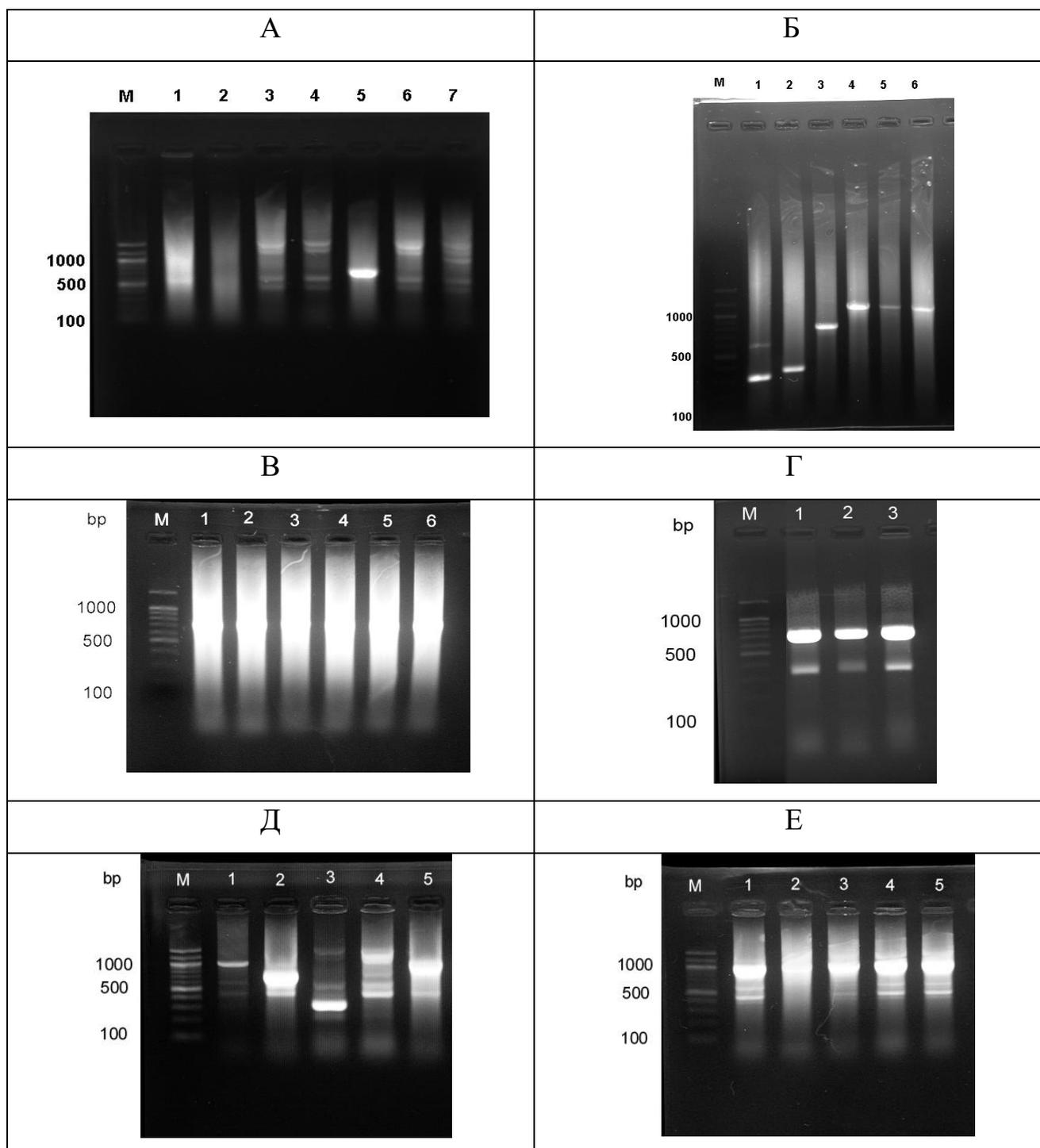
Электрофореграммы ДНК вставок и вектора для клонирования



На треках: 100bp – маркер молекулярного веса 100 bp DNA (СибЭнзим, Новосибирск, Россия), 1kb – маркер молекулярного веса 1kb DNA Ladder (Евроген, Москва, Россия).

## ПРИЛОЖЕНИЕ В

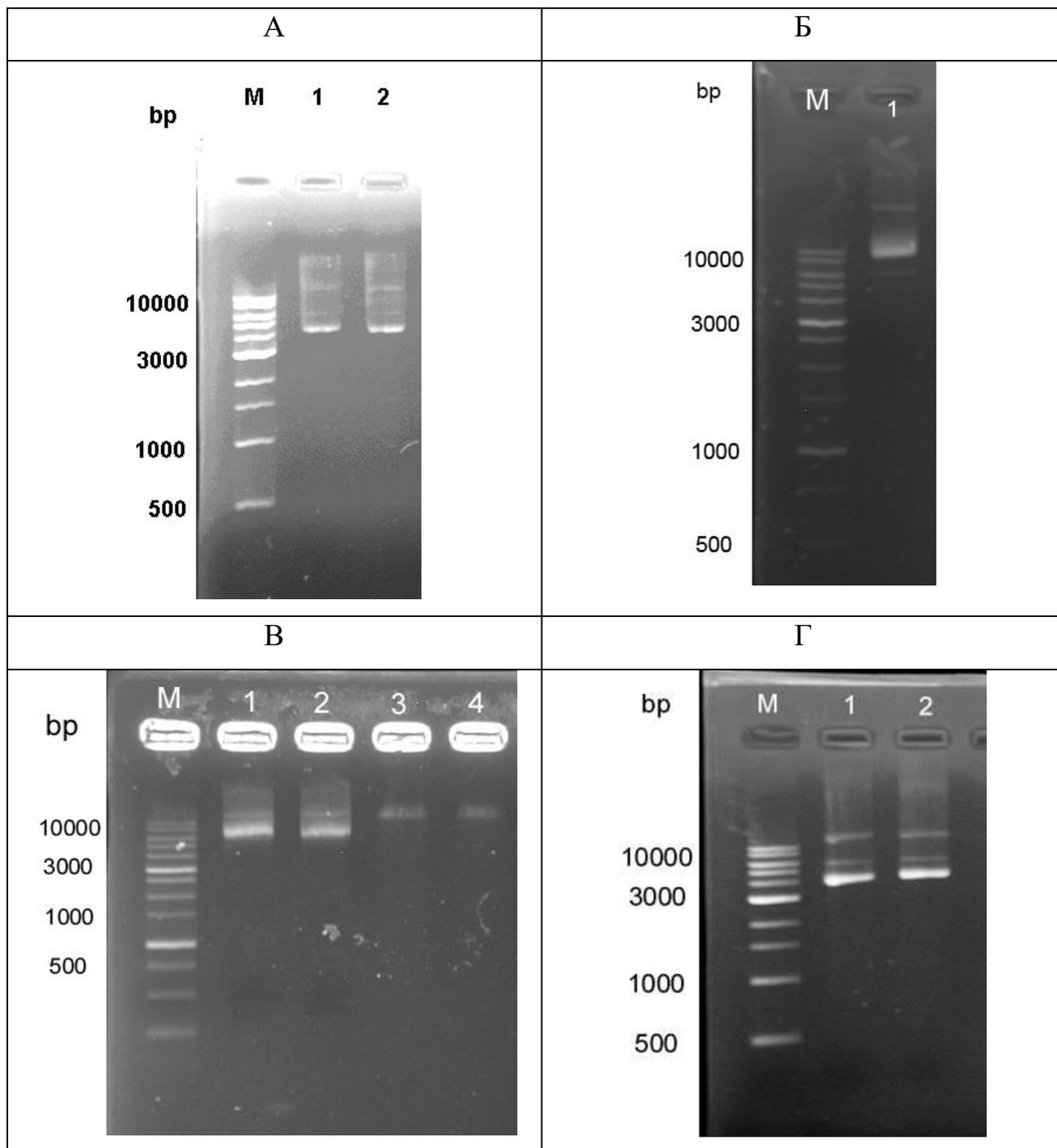
Скрининг клонов *E. coli* на определение размера вставок



На треках: М – маркер молекулярного веса 100 bp DNA (СибЭнзим, Новосибирск, Россия); (А) 1-3 – колонии №1-3 с AVI-MCII-IV, 4-7 – колонии №1-4 с MCI-AVII-IV; (Б) 1-3 – колонии №1-3 с AVI-MCII-IV, 4-6 – колонии №1-3 с MCI-AVII-IV; (В) 1-3 – №1-3 с MCI-III-AVIV, 4-6 – колонии №1-3 с AVI-III-MCIV; (Г) 1-3 – №1-3 с AVI-MCII-III-AVIV; (Д) 1-5 – №1-5 с AVI-MCII-AVIII-IV; (Е) 1-5 – №1-5 с MCI-AVII-MCIII-IV.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Г

### Электрофореграммы плазмидных ДНК



На треках: М – маркер молекулярного веса 1kb DNA Ladder (Евроген, Москва, Россия); (А) 1 – рЕТ22b-МСI-AVII-IV, 2 – рЕТ22b-AVI-МСII-IV; (Б) 1 – рЕТ22b-AVI-МСII-III-AVIV; (В) 1-2 – рЕТ22b-AVI-III-МСIV, 3-4 – рЕТ22b-МСI-III-AVIV; (Г) 1 – рЕТ22b-AVI-МСII-AVIII-IV, 2 – рЕТ22b-МСI-AVII-МСIII-IV.

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. Волкова Т. Г. Волова

« 21 » июля 2024 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 Биология

Химерные белки на основе рекомбинантных  $Ca^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов  
акворина и митрокомина: конструирование, получение и свойства

Руководитель

Л. П. Буракова  
подпись, дата

доцент, к.б.н.  
должность, ученая степень

Л. П. Буракова  
инициалы, фамилия

Выпускник

О. В. Коновалова 13.06.24  
подпись, дата

О. В. Коновалова  
инициалы, фамилия

Красноярск 2024