

ПОЛУЧЕНИЕ ЛЮЦИФЕРАЗЫ ИЗ *METRIDIA LONGA* ПРИ ЭКСПРЕССИИ В SF9 КЛЕТКАХ.

М.Д. Ларионова

научный руководитель к.б.н., с.н.с. С.В. Маркова

Сибирский Федеральный Университет

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии,

Институт биофизики Сибирского отделения Российской Академии Наук

В качестве репортерных молекул для визуализации внутриклеточных процессов в технологиях биоимиджинга часто используются биолюминесцентные белки благодаря их высокой чувствительности, нетоксичности для клеток, широкому линейному диапазону и простоте запускаемых реакций. Многие клонированные люциферазы и фотопротейны уже были успешно апробированы в качестве репортеров на уровне клеточных культур и лабораторных животных.

Объектом исследования является целентеразин-зависимая люцифераза из морской холодноводной копеподы *Metridia longa*. Этот фермент, осуществляющий окисление субстрата (целентеразина) с испусканием голубого света ($\lambda_{\max}=480$ нм), в живой природе является секретлируемым и выделяется из специальных желез рачка при нападении на него хищника. Ранее в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН были идентифицированы гены некоторых изоформ данной секретлируемой люциферазы. В представленной работе описано получение изоформы люциферазы MLuc7, имеющей большую биолюминесцентную активность по сравнению с другими изоформами. Люцифераза MLuc7 является самой малой по размеру из всех известных на сегодняшний день люцифераз (16,5 кДа), что позволяет считать ее более перспективным биолюминесцентным репортером.

Предположительно, нативная люцифераза MLuc7 имеет до 5 дисульфидных связей, поскольку в аминокислотной последовательности белка содержится 10 цистеиновых остатков. Ранее, при экспрессии в *E.coli* люцифераза была выделена из телец включения. В результате анализа полученного белкового образца было установлено, что препарат являлся гетерогенным и склонным к полимеризации, что свидетельствовало о неправильном сворачивании белковой молекулы при экспрессии в прокариотической системе. Это обусловлено тем, что окислительно-восстановительный потенциал бактериальной цитоплазмы и отсутствие соответствующих ферментов не позволяет сформировать дисульфидные связи. Поэтому подбор оптимальных условий экспрессии целевого белка, обеспечивающих правильное формирование третичной структуры люциферазы, являлось ключевой задачей исследования.

При использовании бакуловирусной экспрессионной системы и клеток из насекомого *Spodoptera frugiperda* (Sf9) в качестве продуцентов удалось осуществить высокоэффективную экспрессию и секрецию целевого белка в культуральную среду. Для этого была создана рекомбинантная бакмида на основе плазмиды pFastBac со вставкой в виде гена люциферазы, кодирующего белок со своим собственным сигнальным пептидом из 17 аминокислот (Рис. 1). После отбора клонов методом ПЦР из клеток *E.coli* была изолирована бакмидная ДНК. Далее проводили трансфекцию клеток Sf9 выделенной бакмидой с помощью специального реагента Cellfectin, обеспечивающего эффективное проникновение ДНК в клетки. Вирусным стоком инфицировали культуру клеток насекомых и инкубировали в течение 4 суток при 28°C и при постоянном перемешивании.

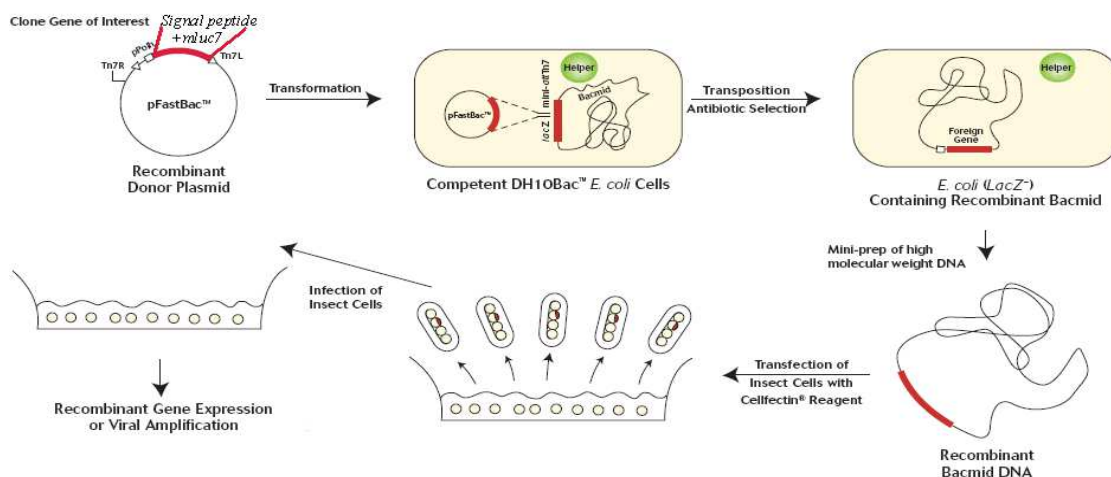


Рисунок 1. Схематическое изображение этапов конструирования рекомбинантной бакмиды и инфицирования клеток Sf9.

Была разработана и оптимизирована процедура очистки целевого белка из культуральной жидкости, включающая осаждение белков сульфатом аммония, хроматографическую очистку, отщепление гистидинового фрагмента с помощью TEV-протеазы и гель-фильтрацию. В результате проведенных процедур был получен гомогенный белковый препарат высокой степени очистки с высокой люциферазной активностью (Рис. 2). Продукция целевого белка составляла 3 мг/л культуральной жидкости.

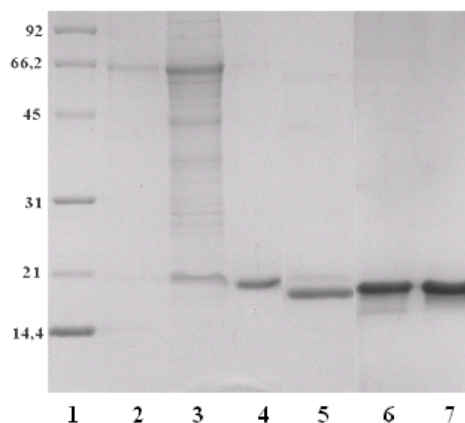


Рисунок 2. SDS-ПААГ-электрофореграмма белковых образцов: 1 – маркеры молекулярного веса, 2 – культуральная жидкость, 3 – растворенный осадок, 4 – препарат после металл-аффинной хроматографии на колонке Ni-trap HP, 5 – расщепление образца TEV-протеазой, 6 – очищенный белковый препарат после расщепления, 7 – образец после проведения гель-фильтрации на колонке Superdex-75.

Описаны некоторые физико-химические и биохимические свойства люциферазы MLuc7. Была исследована зависимость уровня сигнала биолюминесценции от различных параметров, таких как pH, температура и концентрация NaCl. Для оценки степени сродства фермента с субстратом было определено значение константы Михаэлиса.

В результате данного исследования впервые было осуществлено получение люциферазы MLuc7 в нативной форме, разработана методика очистки белка из культуральной жидкости, а также исследованы физико-химические и биохимические свойства люциферазы.