

ГИБРИДНЫЙ БЕЛОК МИНИАНТИТЕЛО-ЛЮЦИФЕРАЗА *Renilla*: ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ РЕПОРТЁРА ДЛЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО ИММУНОАНАЛИЗА

М.А.Шендрик

научный руководитель д-р биол. наук, проф. Л.А.Франк
Сибирский федеральный университет

Одной из главных задач современной биотехнологии является конструирование диагностических систем для медицинских нужд. Современные методы молекулярной диагностики должны обладать высокой специфичностью и чувствительностью и при этом быть достаточно недорогими и безопасными для рутинного применения.

В лаборатории фотобиологии Института биофизики СОРАН разрабатываются методы иммунодиагностики, в которых в качестве репортёрных молекул используются светоизлучающие белки – люциферазы или фотопротеины. Это ферменты, одним из продуктов реакций которых является квант света в видимой области спектра. Получение биолюминесцентных меток осуществляют двумя способами: 1) химическое конъюгирование биоспецифической молекулы (напр., антитела) с молекулой-репортером (напр., люциферазой); 2) с помощью генетического фьюзинга.

Цель настоящей работы – получение гибридного белка пригодного для использования в качестве высокочувствительного и специфичного репортера в биолюминесцентном иммуноанализе вируса клещевого энцефалита.

На рисунке 1 схематически представлены элементы, входящие в состав целевого гибридного белка: домен миниантитела 14D5ab (mAb), специфичного к белку Е (капсидный белок вируса клещевого энцефалита) и домен репортерного белка люциферазы мягкого коралла *Renilla muelleri* Rm7 (RmLuc), между которыми находится гибкий линкер (GGG)₄. Для аффинного выделения на конце конструкции находится гексагистиридиновый фрагмент His-tag. В одном случае гибридный белок содержит лидерный пептид ompA, обеспечивающий транспорт целевого белка в периплазматическое пространство бактериальной клетки, в процессе которого происходит фолдинг домена миниантитела (Рис.1 Б).



Рисунок 1 - Структура целевых гибридных белков

Для получения гибридных белков нами с помощью методов генетической инженерии были получены соответствующие генетические конструкции (А) pFLAG-14D5ab-(GGG)₄ - Rm7-His6 и (Б) pFLAG-OmpA-14D5ab-Rm7-His6, правильность которых подтверждена секвенированием.

Целевой белок А получали синтезом в цитоплазме клетки *E.coli* штамма Rosetta Gami2 (Novagen) трансформированных плазмидой А. Клетки данного штамма содержат мутированные гены тиоредоксин редуктазы и глутатион редуктазы в результате чего существенно активируются реакции образования дисульфидных связей в цитоплазматических белках. В нашем случае это свойство обеспечивает правильный фолдинг домена миниантитела.

При получении того же гибридного белка переносом в периплазматическое пространство использовали клетки *E.coli* штамма BL21 Codon Plus (DE3) RIPL, трансформированные плазмидой Б.

Белки выделяли и очищали металл-аффинной хроматографией на сорбенте Co^{2+} -Агароза (Talon, Clontech). За ходом выделения следили гель-электрофорезом и по биолюминесцентному ции соответствующих фракций.

По данным ДСН- ПААГ электрофореза в обоих типах клеток после ИПТГ-индукции появляется полоса целевого белка с молекулярной массой 63,9 кДа (Рисунок 2), который в случае конструкции А находится в цитоплазме и составляет 1,7% от общего количества белков. После очистки был получен препарат, в котором целевой белок является основным и составляет - 45% от суммарного белка. В случае конструкции Б гибридный белок находится в цитоплазме, периплазматическом пространстве и в тельцах включения (основное количество). После очистки белка его количество настолько мало, что целевой полосы на геле не обнаруживается.

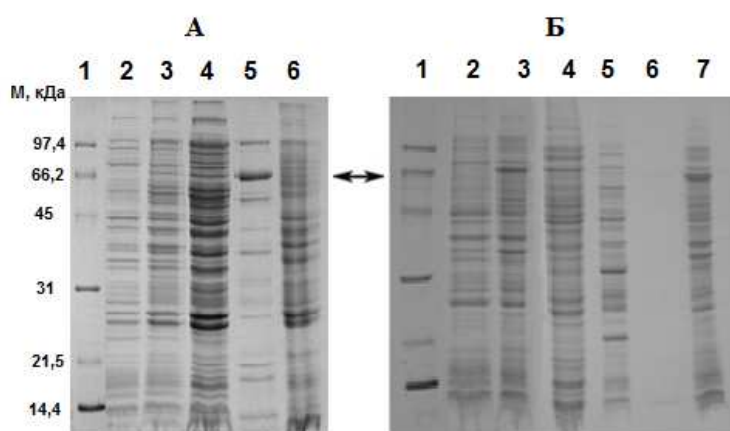


Рисунок 2 - 12.5% ДСН- ПААГ электрофорез образцов, полученных при выделении гибридного белка 14D5ab-Rm7-His6. А. Экспрессия в клетках *E.coli* штамм Rosetta Gami2: 1 – стандартные белки; 2,3 - клетки до и после индукции; 4- цитоплазматическая фракция; 5 - препарат целевого белка после очистки из цитоплазмы; 6 - тельца включения (раствор в 6М мочеvine). Б. Экспрессия в клетках *E.coli* штамм BL21 Codon Plus (DE3) RIPL: 1,2,3,4 – то же, что и на рисунке А; 5 – периплазматическая фракция; 6- препарат целевого белка после очистки из периплазмы; 7- тельца включения (раствор в 6М мочеvine). Стрелкой показана полоса целевого белка.

Распределение целевого белка в полученных фракциях изучали и по биолюминесцентной активности (Рисунок 3). Приведенные значения представляют собой среднее от трех измерений.

В случае конструкции с лидерным пептидом, транспорт целевого белка в периплазматическое пространство составил 25%, однако биолюминесцентная активность периплазматической фракции значительно меньше, чем у цитоплазматических фракций конструкции без лидерного пептида. Количество белка, выделенного с 2,5 грамм биомассы, в целевой фракции после очистки составило 0,013 мг, что также значительно меньше, чем у конструкции без лидерного пептида – 1,2 мг.

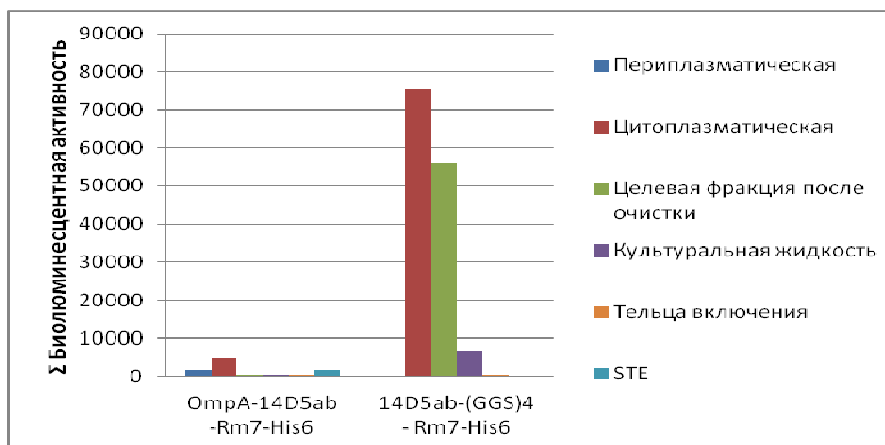


Рисунок 3 – Суммарная биоломинесцентная активность в фракциях после выделения целевого белка, отн. ед.

Таким образом, при экспрессии в цитоплазме клеток *E.coli* Rosetta Gami2 по сравнению с получением гибридного белка переносом в периплазматическое пространство, существенно повышается выход целевого белка (биоломинесцентную активность нормировали по биомассе клеток).

Ключевым свойством полученного гибрида помимо биоломинесценции является аффинность домена антитела к мишени. Взаимодействие полученного гибрида с мишенью исследовали твердофазным биоломинесцентным анализом. В лунки, активированные рекомбинантным белком E (вирусоспецифичный белок, входит в состав капсидной оболочки вируса клещевого энцефалита) вносили аликвоты гибридного белка, инкубировали, промывали и измеряли биоломинесцентную активность образованного на поверхности комплекса. В качестве контроля параллельно исследовали сорбцию на лунки, не активированные белком E. На рисунке 4 показана полученная зависимость биоломинесцентного сигнала от концентрации химерного белка.

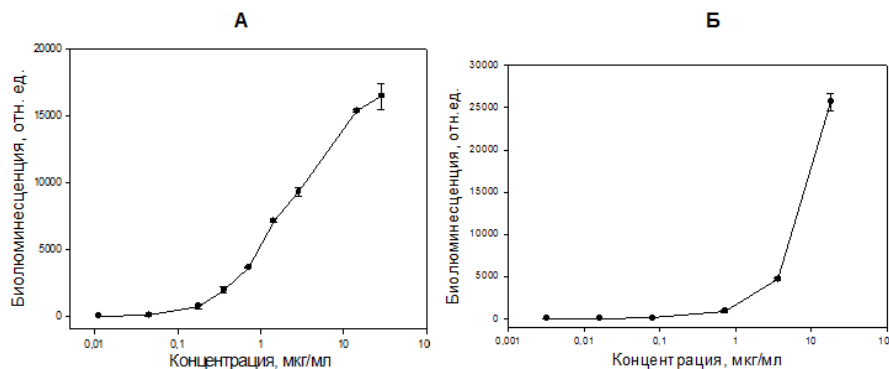


Рисунок 4 - Твердофазный иммуноферментный анализ. Взаимодействия гибридного белка полученного А. из цитоплазмы *E.coli* Rosetta Gami2; Б. из периплазматического пространства *E.coli* BL21 Codon Plus (DE3) RIPL; с рекомбинантным белком E вируса клещевого энцефалита. Каждая точка представляет среднее от трёх независимых определений

Величина константы диссоциации K_d гибридного белка составила $(4,15 \pm 0,35) \times 10^{-8}$, что близко к значению K_d исходного антитела 14D5ab – 6×10^{-8} М (И.К. Байков, ИХБиФМ СО РАН).

Количества целевого белка, полученного переносом в периплазматическое пространство клетки, чрезвычайно мало, что не позволило подсчитать его K_d .

Пригодность полученной метки для выявления вируса клещевого энцефалита проверяли с использованием коммерческого набора “ВектоВКЭ – антиген”

предназначенного для диагностики вируса клещевого энцефалита фирмы Вектор БЕСТ (Новосибирск). Анализ проводили по протоколу производителя с использованием образцов положительного и отрицательного контроля. Для выявления антигена в лунки вносили растворы нашей метки в 2-х разных концентрациях с биолюминесцентной активностью 22 и 44 относительные световые единицы. В таблице 1 представлены результаты измерений биолюминесцентного сигнала при взаимодействии метки с положительным и отрицательным контролем. Приведенные значения представляют собой среднее от трех измерений.

Таблица 1 – Выявление антигена в коммерческом наборе Вектор-Бест полученной биолюминесцентной меткой

Активность метки, отн.ед	Биолюминесцентный сигнал, отн.ед.	
	22	44
Контроль -	41,24 ± 13,05	17,78 ± 2,37
Контроль +	1939,13 ± 114,41	1222,525 ± 240,17

Из таблицы видно, что независимо от количества используемой метки значения биолюминесценции в образцах с положительным контролем на порядок и более выше, чем в образцах с отрицательным контролем.

Таким образом, созданный нами штамм-продуцент рекомбинантных клеток *E.coli* Rosetta Gami2/pFLAG-14D5ab-(GGS)₄-Rm7-His6 экспрессирует в цитоплазму целевой гибридный белок, обладающий биолюминесцентной активностью люциферазного домена и аффинностью к вирусу клещевого энцефалита домена антитела. Показана пригодность полученного белка как репортёра в иммуноанализе для выявления вируса клещевого энцефалита.