

ПОЛУЧЕНИЕ БИОТИНИЛИРОВАННОГО *IN VIVO* ФОТОПРОТЕИНА ОБЕЛИНА ПРИ ЭКСПРЕССИИ В *E. COLI*.

Ларионова М.Д.

Научный руководитель – к.б.н. С.В. Маркова

Сибирский федеральный университет

Производные Ca^{+2} -регулируемого фотопротеина обелина, включая его биотинилированные формы, применяются в качестве биолюминесцентных меток в ряде аналитических приложений. Биотин-авидиновая система основана на высоком сродстве биотина к белку авидину. Эта система широко применяется в медицине и биологии для высокочувствительной детекции различных белковых молекул, очистки и иммобилизации белков. Химическое биотинилирование белков *in vitro* имеет ряд недостатков: процесс приводит к инактивации белков, продукт реакции является гетерогенной фракцией, что предполагает дополнительную очистку полученного модифицированного белка от побочных продуктов. Существует альтернатива химическому биотинилированию – ферментативное биотинилирование *in vivo*. Методы *in vivo* предназначены для направленного присоединения биотина к специфическому акцепторному сайту – короткой аминокислотной последовательности, генно-инженерно слитой с рекомбинантным белком.

Биотинилирование в живых клетках – достаточно редкая модификация. В клетках *E. coli* биотинилируется только один белок – биотин-карбоксил переносящий белок (ВССР), который является субъединицей ацетил-СоА-синтетазы. Ферментом, отвечающим за присоединение биотина к белкам, является биотин-протеин лигаза (BPL). BPL катализирует посттрансляционное формирование амидной связи между карбоксильной группой биотина и ϵ -аминогруппой специфического лизинового остатка целевого белка. Наиболее изученным из биотин-протеин лигаз является многофункциональный белок BirA из *E. coli*, который действует еще и как транскрипционный репрессор биотин-синтазного оперона (*bio*). BPL в *E. coli* (ген *birA*) является мономерным белком массой 35,5 кДа, и это единственный белок (BirA protein) из BPL-множества с известной структурой. BirA *E. coli* - это ассиметричный белок, состоящий из трех доменов (Рис.1).

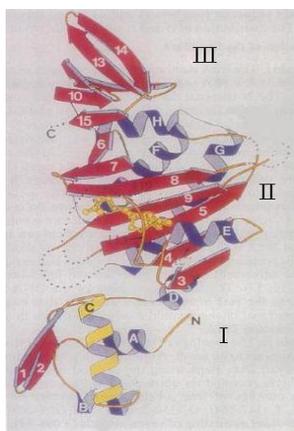


Рис. 1. Строение многофункционального белка BirA *E. coli*.

I - N-терминальный ДНК-связанный домен, действующий как репрессор биотин-синтазного оперона, II - центральный каталитический домен, III - C-терминальный домен.

При определении субстратной специфичности биотин-лигазы из *E. coli* методами фагового дисплея был получен ряд искусственных пептидов, эффективно

биотинилируемых *in vivo*. Ранее в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН две из полученных последовательностей были проверены при создании экспрессионной конструкции для биотинилирования обелина *in vivo* при экспрессии в *E. coli*. К сожалению, только менее 20% рекомбинантного обелина оказывалось биотинилированным. Предположительно, это было связано с малым количеством молекул внутриклеточной биотин-протеин лигазы в *E. coli*, ресурсов которой недостаточно для биотинилирования синтезируемого рекомбинантного обелина, количество которого может достигать ~70% от тотального количества клеточных белков. Предполагается, что включение гена биотин-протеин лигазы в разрабатываемую экспрессионную конструкцию позволит более эффективно биотинилировать *in vivo* рекомбинантные белки.

Ген *birA* был амплифицирован из генома *E. coli*. Ген биотин-протеин лигазы был помещен в экспрессионную систему pET сразу за геном обелина через трансляционное ATGA стоп-старт перекрывание, которое реализовано в геноме *E. coli*, оно обеспечивает меньший уровень экспрессии нижестоящего белка. К гену обелина с N-конца был присоединен искусственный биотин-акцепторный пептид №91 (23 а/к), являющийся субстратом для биотин-протеин лигазы. ДНК-связанный домен в *BirA*, являющийся репрессором биотин-синтазного оперона, был удален для улучшения экспрессионных характеристик полученного штамма-производителя. Итак, были получены 2 конструкции, экспрессирующие рекомбинантные белки: pET19b-Bio91-OL-ATGA-*birA* включающая полноразмерный ген биотин-лигазы и pET19b-Bio91-OL-ATGA-*Bcl-birA*, включающая ген биотин-протеин лигазы без 63 аминокислот, кодирующих ДНК-связанный домен (в место, где находилась последовательность, кодирующая домен, введен рестрикционный сайт *Bcl*). Полученные экспрессионные системы были проверены секвенированием.

Полученные конструкции были трансформированы в клетки *E. coli*. Экспрессируемые рекомбинантные белки "пакуются" клетками в виде нерастворимых агрегатов (телец включения). Целевой апобелок был экстрагирован из телец включения и очищен путем ионообменной хроматографии. Были получены образцы высокой степени очистки (Рис. 2).

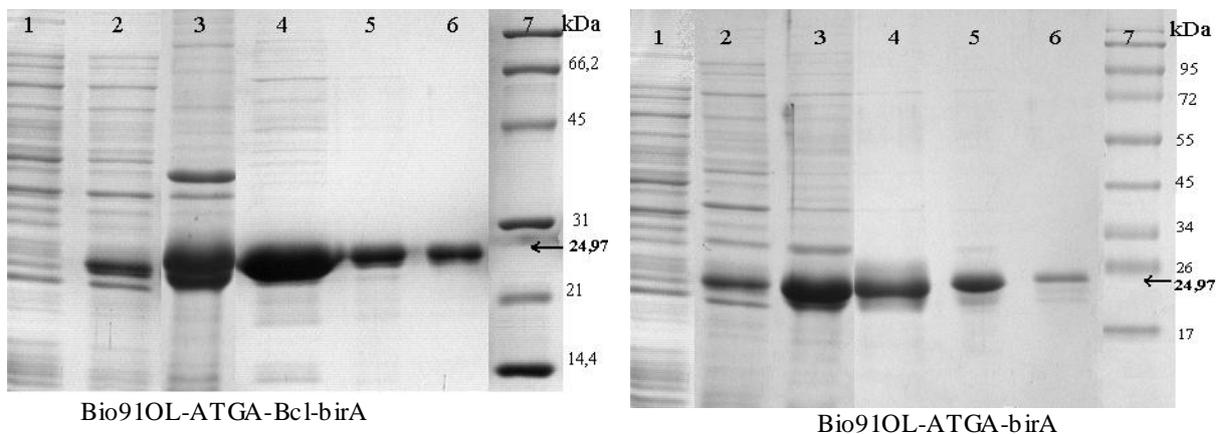


Рис. 2. SDS-ПААГ-электрофорез белковых образцов, полученных при выделении рекомбинантного биотинилированного обелина из клеток *E. coli*: 1, 2 – тотальные клеточные белки до и после индукции, соответственно; 3 – тельца включения индуцированных клеток в 6М мочеvine; 4 – биотинилированный апообелин после ионообменной хроматографии; 5 – обессоленный путем гель-фильтрации апобелок, 6 – биотинилированный активный фотопротейн обелин после ионообменной хроматографии, 7 – маркеры молекулярного веса. Молекулярная масса белков соответствует теоретической – 24,97 kDa.

Для демонстрации возможности использования полученных производных обелина в качестве метки в биолюминесцентном иммуноанализе был проведен модельный твердофазный анализ, схема которого представлена на Рис. 3. Для контроля в модельном анализе был взят обелин, биотинилированный химически. Очевидно, метка включается в стрептавидин-биотиновый комплекс, формирующийся на поверхности лунок, и позволяет определять сорбированный BSA-биотин из растворов с концентрациями от 1 нг/мл до 30 нг/мл. Величина биолюминесцентного сигнала прямо пропорциональна концентрации растворов BSA-биотин. Как говорилось ранее, биолюминесцентный сигнал при химическом биотинилировании белка снижается, что и продемонстрировано на графике (Рис. 3).

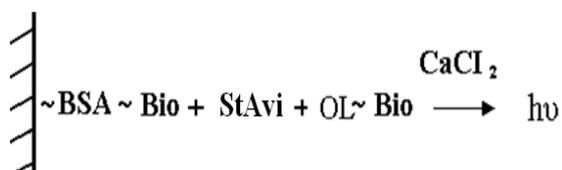
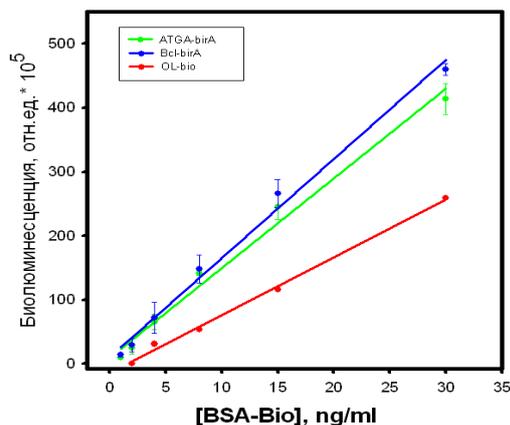
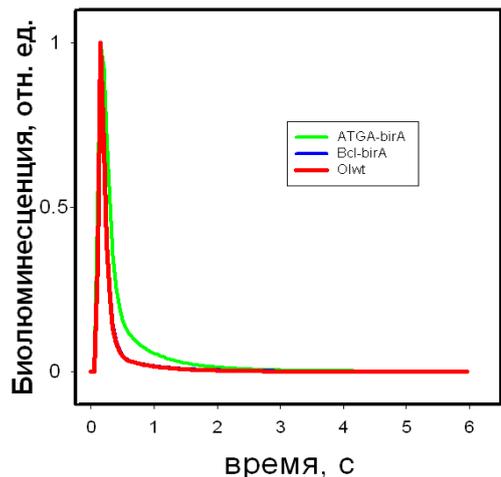
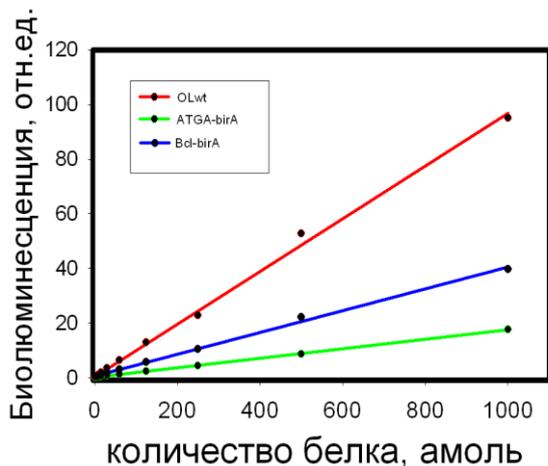


Рис. 3. Схема и результаты модельного твердофазного биолюминесцентного анализа.



Были проведены исследования свойств полученных белков. Кинетика ферментативной реакции полученных рекомбинантных белков практически не отличается от таковой обелина дикого типа, ведь присоединение биотин-акцепторного пептида не влияет на конформационную структуру фотопротейна. Минимальная концентрация рекомбинантных белков, при которой регистрируется биолюминесцентный сигнал, составляет 1 аттомоль (10^{-18} моль), что совпадает с пределом обнаружения обелина дикого типа (Рис.4).



А

Б

Рис. 4. Исследования биофизических свойств рекомбинантных белков. А – измерения кинетики ферментативной реакции; Б – нахождение предела обнаружения рекомбинантных белков. Контроль – обелин дикого типа.

Были проведены измерения доли биотинилированного белка по методу Грина. Оказалось, что белок, синтезируемый конструкцией, включающей полноразмерный ген биотин-протеин лигазы (pET19b-Bio91-OL-ATGA-birA), биотинилировался с эффективностью 35%. Обелин, экспрессируемый конструкцией с укороченным вариантом гена *birA* (pET19b-Bio91-OL-ATGA-Bcl-birA), был биотинилирован с эффективностью 80%.

В ходе данной работы были получены следующие результаты:

1. Получены плазмидные конструкции для коэкспрессии фотопротейна обелина, содержащего биотин-акцепторный пептид, с 2 вариантами гена биотин-протеин лигазы *E. coli*. Конструкции подтверждены секвенированием.
2. Рекомбинантные белки обоих вариантов, а также немодифицированный обелин для сравнения очищены хроматографически из телец включения. Получены активные препараты высокой степени очистки.
3. Определены основные биологические свойства: полученные гибридные белки обладали кинетическими характеристиками, сходными с таковыми обелина дикого типа. Предел обнаружения рекомбинантных белков идентичен минимальной концентрации обелина дикого типа, при которой регистрируется биolumинесцентный сигнал (1 амоль).
4. Показано, что эффективность биотинилирования обелина *in vivo*, экспрессируемого совместно с укороченной биотин-лигазой BirA, составляет не менее **80%**.
5. В модельном биolumинесцентном анализе данный препарат показал большую чувствительность в сравнении с химически биотинилированным обелином, имея в 2 раза больший биolumинесцентный сигнал.

Данная работа проводилась на базе лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН.