

Получение нативной люциферазы *Metridia*, содержащей множественные дисульфидные связи, окислительным рефолдингом из телец включения *E. coli*

Научный руководитель – Маркова Светлана Владимировна

Горбунова Дарья Андреевна

Студент (магистр)

Сибирский федеральный университет, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, Красноярск, Россия

E-mail: gorbunova_dacha@mail.ru

Небольшая секретрируемая люцифераза морских копепод *Metridia longa* катализирует простую реакцию окисления целентеразина без каких-либо кофакторов с испусканием голубого света [1]. Люцифераза представлена несколькими неаллельными изоформами, каждая из которых содержит по десять консервативных остатков Cys, что предполагает наличие до пяти S-S-связей на молекулу люциферазы. Среди изученных изоформ MLuc7 люцифераза имеет наименьшие размеры 16.5 кДа при наивысшей активности [3]. Высокая активность и стабильность MLuc7 предполагает большой потенциал использования этой изоформы в качестве биолюминесцентного репортера для различных аналитических приложений. Несмотря на все более успешное использование изоформ люциферазы *M. longa* в качестве биолюминесцентных репортеров в биомедицинских исследованиях *in vivo* [2], до сих пор остается проблематичным ее использование в анализах *in vitro* вследствие трудностей получения значительных количеств нативной рекомбинантной люциферазы.

Целью данного исследования была разработка технологии получения значительных количеств высокоактивной рекомбинантной люциферазы MLuc7 путем окислительного рефолдинга из бактериальных телец включения. *E. coli* является наиболее выгодным хозяином для продуцирования рекомбинантных белков, но окислительно-восстановительный потенциал бактериальной цитоплазмы препятствует образованию дисульфидных связей рекомбинантного белка, и как следствие, правильному фолдингу люциферазы *M. longa*, содержащей множественные дисульфидные связи. Видимо поэтому, в значительных количествах экспрессировать в *E. coli* рекомбинантную люциферазу *M. longa* удалось только в нерастворимой фракции в виде телец включения.

Для получения биологически активной MLuc7 люциферазы из телец включения, проводился окислительный рефолдинг после солюбилизации и полного восстановления денатурированного белка 100 мМ ДТТ. Разработанная методика рефолдинга позволила получить люциферазу MLuc7 в клетках *E. coli* с выходом белка высокой чистоты не менее 6 мг/л с правильно сформированными дисульфидными связями и биолюминесцентными свойствами (удельная активность, кинетика светового сигнала, pH и температурный оптимум биолюминесценции, термостабильность), идентичными свойствам нативной MLuc7, полученной из клеток насекомых [3]. Применение клеток *E. coli* для продуцирования рекомбинантной люциферазы *M. longa* проще, быстрее и экономичнее по сравнению с производством в клетках насекомых.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности в рамках научного проекта № 16-44-242099.

Источники и литература

- 1) Маркова С.В., Высоцкий Е.С. // Биохимия. 2015. Т. 80. No. 6. С. 845-866.

- 2) Маркова С.В., Маликова Н.П., Высоцкий Е.С., Франк Л.А., Гительзон И.И. // Биофизика. 2017. Т. 62. No. 3. С. 618–624.
- 3) Markova S.V., Larionova M.D., Burakova L.P., Vysotski E.S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2015. 457. 77–82.