

Гетерологическая экспрессия гена родопсина *Leptosphaeria maculans* и его очистка

Научный руководитель – Горделий Валентин Иванович

Дмитриева Наталья Игоревна

Студент (магистр)

Московский физико-технический институт, Москва, Россия

E-mail: dmitrieva.ni@mail.ru

Объект нашего исследования — родопсин LR из микроорганизма *Leptosphaeria maculans*, являющегося сумчатым грибом, возбудителем фомоза рапса. Заболевание проявляется повсюду, где выращивают капустные культуры, недобор урожая вызванный грибом может составлять до 50%. LR представляет значительный интерес, так как это один из первых опсинов, открытых вне царств архей и животных [1]. Родопсины LR и bR *H. salinarum* имеют идентичные ключевые аминокислотные остатки, вовлечённые в индуцируемый светом перенос протона, что даёт основания ожидать сходную биологическую активность. Примечательно, что схожие ретиналь-связывающие белки обнаружены в столь далеких друг от друга царствах, как археи и грибы. Была показана возможность гетерологической экспрессии LR в клетках *P. pastoris*, а также установлено, что белок является протонной помпой, однако физиологическая роль белка не выяснена [2].

Ген укороченного белка LR (49-313) с полигистиновой последовательностью на C-конце был экспрессирован нами в клетках *Leishmania tarentolae*. Экспрессионная система LEXSY была выбрана для работы с этим белком, так как ранее экспрессия в *E. coli* давала низкий выход белка, и наработать достаточное для структурных исследований количество очищенного белка не представлялось возможным. Был создан плазмидный вектор для рекомбинирования и экспрессии указанного гена LR, проведена трансфекция *L. tarentolae* плазмидным вектором и отбор клонов, производящих целевой белок в наибольших количествах. Далее штамм-продуцент культивировали, мембранную фракцию после лизиса наработанной биомассы солибилизировали, белок очищали с помощью аффинного металл-хелатного сорбента методом бэтч. Элюированные фракции анализировали с помощью ДСН-ПААГ, вестерн-блота, аналитической гель-фильтрации, спектрофотометрии (рис.1). Наилучшие фракции подвергали дополнительной очистке с помощью гель-фильтрации, аналогично [3]. Полученный препарат LR имеет степень чистоты и гомогенности достаточные для кристаллизации *in meso*, что даёт основания преступить к структурным исследованиям родопсина *L. maculans*.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект No 16-15-00242).

Источники и литература

- 1) Idnurm, A., Howlett, B.J. Characterization of an opsin gene from the ascomycete *Leptosphaeria maculans*. NRC Research Press, 2001, DOI: 10.1139/gen-44-2-167
- 2) Waschuk, S.A., Bezerra, A.G., Lichi Shi, Jr., Brown, L.S., Stroud, R.M. Leptosphaeria rhodopsin: Bacteriorhodopsin-like proton pump. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 102, No. 19 (May 10, 2005), pp. 6879-6883

- 3) Gushchin, I., Chervakov, P., Kuzmichev, P., Popov, A.N., Round, E., Borshchevskiy, V., Ishchenko, A., Petrovskaya, L., Chupin, V., Dolgikh, D.A. and Arseniev, A.S., 2013. Structural insights into the proton pumping by unusual proteorhodopsin from nonmarine bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(31), pp.12631-12636

Иллюстрации

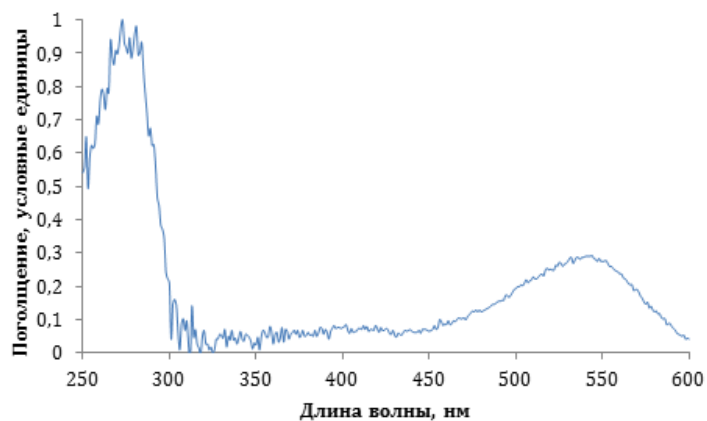


Рис. 1. рис.1. Спектр очищенного препарата белка LR