

УДК 577.158.54

ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ ЛЮЦИФЕРАЗА-СТРЕПТАВИДИН. ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА

Д.В. Смирнова, М.И. Кокшаров, И.Н. Зоров, Н.Н. Угарова

*(кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ;
e-mail: S_mir_nova@mail.ru)*

Сконструированы плазмиды, кодирующие гены гибридных белков термостабильного мутанта (TS) люциферазы светляков *Luciola mingrelica* (Luc) со стрептавидином (SA) и полигистидиновой последовательностью (His₆) на N- или C-конце белка: SA-Luc-His₆, His₆-SA-Luc, Luc-SA-His₆. Гибридные белки нарабатаны, очищены, изучены их состав, люциферазная активность, термостабильность, спектры биолюминесценции и способность связывать биотин. Введение стрептавидаина не влияет на спектры биолюминесценции, но при 47°C уменьшает термостабильность вдвое. Методом эксклюзионной хроматографии показано, что в зависимости от структуры плазмиды гибридные белки экспрессируются в виде димеров, тетрамеров и более высокомолекулярных олигомеров, которые отличаются по люциферазной активности и способности связывать биотин. Наиболее оптимальными свойствами обладает гибридный белок His₆-SA-Luc.

Ключевые слова: люцифераза светляков, *Luciola mingrelica*, гибридный белок, стрептавидин, олигомерные формы.

Биотин-стрептавидиновые высоко аффинные взаимодействия ($K_d = 10^{-15}$ М) широко используются в разных областях биохимии и молекулярной биологии. На их основе создано множество биоаналитических реагентов, где комплекс биотин-стрептавидин выступает в качестве мостика между изучаемыми молекулами. Гибридные белки, содержащие стрептавидин, получают как химической конъюгацией, так и генно-инженерным путем, причем последний способ является приоритетным, поскольку химическая конъюгация не всегда позволяет воспроизводимо получать гибриды строго определенной стехиометрии. Гибридные белки со стрептавидином получены для белка А [1], ТАТ-белка [2], золотосвязывающего белка и его конъюгата с пероксидазой хрена [3], а также для различных небольших белков (менее 80 ам.о.), таких как натрийуретические пептиды [4].

Среди гибридных белков стрептавидаина особое место занимают белки на основе фотопротеинов, сочетающие высокую чувствительность детекции фотопротеина с высокой селективностью стрептавидаина. Это открывает возможности использования таких белков в биоаналитических системах [5]. Для акворина были получены конъюгаты со стрептавидином химическим путем [6]. Гибридный белок акворин-стрептавидин в клетках *E. coli* экспрессировался в виде телец включения, что требует проведения процедуры рефолдинга [7]. Нативные гибридные белки

стрептавидаина с зеленым флуоресцентным белком [8] и люциферазой *P. plagiophthalmus* [9] были получены в клетках насекомых *S. frugiperda*. В клетках *E. coli* были получены гибридные белки для зеленого флуоресцентного белка [10] и люциферазы светляков *Luciola lateralis* [11]. Однако отсутствие His₆ в упомянутых конструкциях значительно усложняет процедуру выделения и очистки гибридных белков. Гибридный белок люциферазы светляков со стрептавидином, содержащий His₆, описан в статье [12], однако активность гибридного белка составляет всего 10% от активности исходной люциферазы. Известно, что стрептавидин образует тетрамеры, которые обладают высоким сродством к биотину [13]. Однако данные об олигомерном составе полученных гибридных белков, весьма важные для правильной интерпретации аналитических данных, отсутствуют.

Цель данной работы – конструирование плазмид для высокоэффективной экспрессии гибридного белка люциферазы светляков со стрептавидином, наработка высокоочищенных продуктов, изучение их олигомерного состава и физико-химических характеристик. В качестве люциферазы был использован высокоактивный термостабильный мутант (TS) люциферазы *Luciola mingrelica* [14]. В результате сравнения разных конструкций была выбрана оптимальная для получения гибридного белка с высокой активностью стрептавидаина и люциферазы.

Материалы и методы

Использовали аденозин-5'-трифосфат (АТФ), ди-тиотреитол (ДТТ), бычий сывороточный альбумин (БСА) («Sigma», США), D-люциферин (LH₂) («Люмтек», Россия), олигонуклеотиды («Синтол», Россия), TaqSE ДНК-полимеразу фага («СибЭнзим», Россия), Taq ДНК-полимеразу, T4 ДНК-лигазу («Силекс», Россия) и ряд рестриктаз фирм «СибЭнзим» (Россия), «Fermentas» (Литва) и «Boehringer Mannheim» (Германия). Для выделения плазмид из клеток *E. coli* и элюции фрагментов ДНК из агарозного геля использовали наборы фирмы («Qiagen», Германия). Использовали набор для биотинилирования фирмы «Силекс» (Россия). Металло-хелатную хроматографию проводили на колонке HisTrap HP, эксклюзионную хроматографию проводили на колонке Superose 12 («GE healthcare», США).

Конструирование плазмид, кодирующих гибридные белки. Использовали ген TS люциферазы *Luciola mingrelica* [14] и минимальный участок гена стрептавидина (119 ам.о.) из полного гена стрептавидина, любезно предоставленного В.Г. Григоренко. Ген стрептавидина клонировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя в качестве матрицы ДНК *Streptomyces avidinii*. Для амплификации использовали олигонуклеотиды, представленные на схеме 1. При этом к С-концу стрептавидина был добавлен полипептид SSGGSME. В начале и конце нуклеотидной последовательности были введены сайты рестрикции NdeI и NcoI соответственно (подчеркнуты). ПЦР-продукт был обработан по соответствующим сайтам рестрикции. Из плазмиды, содержащей ген люциферазы (pJGtrc [15] или pETL4 [16]), был вырезан начальный участок гена по сайтам NcoI и BamHI. Фрагменты NdeI-NcoI и NcoI-BamHI субклонировали в вектор pETL7 (GenBank No. HQ007050),

содержащий ген TS люциферазы [17], по сайтам NdeI и BamHI. В результате получили плазмиду, кодирующую белок SA-Luc-His₆, на основании которой получена плазида SA-Luc-His₆M/G с заменой в гене люциферазы стартового кодона Met на Gly. Для этого фрагмент плазмиды SA-Luc-His₆, содержащий ген стрептавидина и регуляторный участок T7-промотора, амплифицировали методом ПЦР с использованием праймеров, представленных на схеме 2. При этом был введен сайт рестрикции Hind III (подчеркнут). Полученный ПЦР-фрагмент разрезали по сайтам рестрикции NdeI и Hind III и субклонировали в вектор BsAp 4TS-Lml-pETL7 [18]. Для получения плазмиды His₆-SA-Luc из плазмиды SA-Luc-His₆ вырезали фрагмент Nde-BglIII, содержащий ген стрептавидина и часть гена люциферазы. Из плазмиды pETL4 вырезали фрагменты BglIII-Pst, PstI-NdeI, которые лигировали с фрагментом Nde-BglIII.

Для получения плазмиды Luc-SA-His₆ ген стрептавидина амплифицировали методом ПЦР с использованием праймеров, представленных на схеме 3. В начале и конце нуклеотидной последовательности были введены сайты рестрикции ApaI и XhoI соответственно (подчеркнуты). С N-конца стрептавидина был добавлен полипептид GPSGGGSA, а с С-конца – полипептид GVE. ПЦР-продукт обработали по соответствующим сайтам рестрикции (ApaI и XhoI). Из плазмиды pETL7 вырезали ген TS люциферазы по сайтам рестрикции NheI и ApaI. Фрагменты NheI-ApaI и ApaI-XhoI субклонировали в вектор pETL7 по сайтам NheI и XhoI. В результате получили плазмиду, кодирующую белок Luc-SA-His₆, содержащий линкер SGGGSA между генами люциферазы и стрептавидина, а также полипептид GVЕНННННН на С-конце (His₆). Структуры плазмид, подтвержденные методом секвенирования, показаны на рис. 1.

Схема 1

Прямой 5'-TTATATTAACATATGGGCATCACCGGCACCTGGTAC-3' и
обратный 5'-TTCCAATGGAACCGCCACCAGACACCTTGGTGAAGGTGTCG-3'.

Схема 2

Прямой 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' и
обратный 5'-CAAAAGCTTGGAACCGCCACTAGACACC-3'.

Схема 3

Прямой 5'-TCGGGCCCATCTGGTGGAGGTGGCAGTGCAGGCATCACCGGCACCTGG-3' и
обратный 5'-GTGCTCGAGACCCACCTTGGTGAAGGTGTCGTTGG-3'.

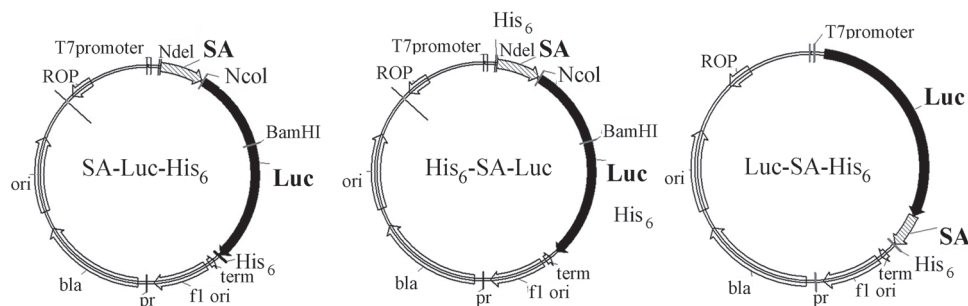


Рис. 1. Структуры плазмид, кодирующих гибридные белки люцифераза-стрептавидин

Полученные плазмиды трансформировали в клетки *E. coli* XL1-Blue, нарабатывали и выделяли в необходимом для дальнейших исследований количестве. Ферменты экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3) *CodonPlus*, выделяли и очищали с использованием металло-хелатной хроматографии по методу, описанному ранее [16]. Концентрацию гибридных белков определяли по оптической плотности раствора при 280 нм (1,0 ед. опт. плотности соответствует раствору, содержащему 1 мг/мл белка).

Люциферазную активность очищенных гибридных белков определяли по величине максимальной интенсивности биолюминесценции при насыщающих концентрациях субстратов (1 мМ АТФ и 0,3 мМ LH_2) на люминометре «FB 12» («Zylux», США) [16].

Изучение олигомерного состава гибридных белков проводили методом эксклюзионной хроматографии на колонке Superose 1 10/300 GL («GE», США) с использованием хроматографической системы «АКТАpurifier 10» («GE», США).

100 мкл раствора гибридного белка, содержащего 20 мМ Na-фосфат, 0,5 М NaCl, 300 мМ имидазол, 2 мМ ЭДТА (pH 7,5), наносили на колонку, уравновешенную буферным раствором (50 мМ трис-ацетат, 100 мМ Na_2SO_4 (pH 7,8)), и элюировали тем же раствором со скоростью 0,3 мл/мин. Отбирали фракции объемом 0,5 мл. В каждой фракции определяли люциферазную активность гибридных белков, используя субстратную смесь, содержащую 0,025 М KH_2PO_4 ; 0,025 М K_2HPO_4 ; 2 мМ ЭДТА; 7,5 мМ MgSO_4 ; 1 мМ АТФ; 0,15 мМ LH_2 ; 1% Неонол-10; 50 мкМ $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (pH 7,8). При этом наблюдался стабильный биолюминесцентный сигнал в течение нескольких минут. Добавляли 10 мкл разбавленного раствора гибридного белка в буферном растворе к 90 мкл субстратной смеси и регистрировали биолюминесцентный сигнал на люминометре «ЛЮМ-1» («Люмтек», Россия).

Изучение необратимой термоинактивации гибридных белков. Готовили раствор гибридного белка (0,01 мг/мл) в охлажденном в снегу 50 мМ трис-

ацетатном буферном растворе (pH 7,8), содержащем 20 мМ MgSO_4 , 2 мМ ЭДТА, 0,2 мг/мл БСА. В 8–12 тонкостенных микропробирках объемом 0,5 мл вносили по 50 мкл раствора гибридного белка и инкубировали в водном термостате при температуре 47°C. Через определенные промежутки времени отбирали одну пробирку и охлаждали в снегу не менее 15 мин. Для определения активности люциферазы 10 мкл раствора гибридного белка прибавляли к 90 мкл субстратной смеси и регистрировали биолюминесцентный сигнал на приборе «Spectramax-L» («Molecular devices», США).

Спектры биолюминесценции регистрировали на люминесцентном спектрометре «Spectramax-M5» («Molecular devices», США) в режиме «биолюминесценция» для раствора белка, содержащего 10 мкл 10^{-9} М гибридного белка и 90 мкл субстратной смеси.

Способность гибридных белков связывать биотин. Биотинилированный БСА получали по методике фирмы «Силекс», разбавляли до концентрации 5 мкг/мл в 50 мМ Na_2CO_3 (pH 9,6). Параллельно готовили раствор небитинилированного БСА в такой же концентрации и в том же растворе. По 100 мкл полученных растворов БСА вносили в лунки планшета для иммуноферментного анализа и инкубировали в течение ночи при 4°C при постоянном перемешивании. Затем планшет три раза промывали порциями по 200 мкл буферного раствора PBST (pH 7,6; 0,01 М Na-фосфат; 0,15 М NaCl; 0,1% Tween-20), свободную поверхность блокировали 1%-м БСА (2 ч, 37°C, 250 об/мин) и три раза промывали порциями по 200 мкл буферного раствора PBST. В лунки подготовленного планшета вносили по 100 мкл раствора гибридного белка в PBST, инкубировали 1 ч (37°C, 250 об/мин) и промывали порциями по 200 мкл PBST. Затем в лунки вносили по 100 мкл субстратной смеси и измеряли биолюминесцентный сигнал. Для определения исходной активности гибридного белка к 20 мкл его раствора добавляли 80 мкл субстратной смеси, перемешивали и измеряли биолюминесцентный сигнал.

Результаты и их обсуждение

Экспрессия гибридных белков. Полученные плазмиды были наработаны в необходимом количестве и трансформированы в клетках *E. coli* 21DE3. Выращивание и лизис биомассы гибридных белков проводили по методу [16]. Гибридные белки очищали методом металло-хелатной хроматографии. Результаты представлены в таблице. Высокий процент связывания с колонкой указывает на доступность His₆ для связывания с сорбентом. Существенное снижение связывания Luc-SA-His₆ можно объяснить особенностями структуры данного гибридного белка, снижающими доступность His₆ для связывания с колонкой. Несмотря на значительное снижение выхода гибридных белков в растворимой форме по сравнению с выходом исходной люциферазы (таблица), белки нарабатывались в достаточном для их дальнейшего исследования количестве, и для их экспрессии не требовалось использования шаперонов в отличие от работы [12], где экспрессию проводили в присутствии последних. Значения удельной активности препаратов гибридных белков SA-Luc-His₆, SA-Luc-His₆M/G и His₆-SA-Luc составили 30–50% от активности исходной люциферазы и были в два раза выше, чем активность Luc-SA-His₆.

SDS-электрофорез в полиакриламидном геле очищенных гибридных белков (рис. 2) показал, что для SA-Luc-His₆ и SA-Luc-His₆M/G наблюдаются две полосы (гибридный белок и люцифераза), что свидетельствует о наличии в препарате свободного фермента. Замена стартового Met на Gly привела к снижению содержания свободной люциферазы в два раза по сравнению с SA-Luc-His₆. Это можно объяснить тем, что для SA-Luc-His₆M/G не происходит коэкспрессии свободной люциферазы. Однако ее присутствие указывает на то, что в процессе получе-

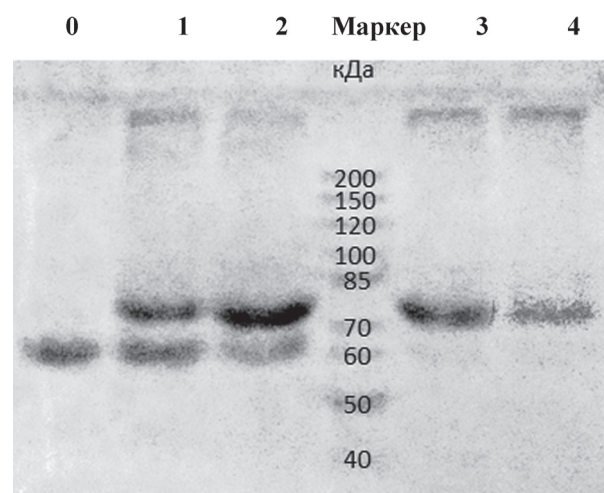


Рис. 2. SDS-электрофорез в 10%-м полиакриламидном геле для исходной люциферазы и гибридных белков люцифераза-стрептавидин (0 – люцифераза, 1 – SA-Luc-His₆, 2 – SA-Luc-His₆ M/G, 3 – His₆-SA-Luc, 4 – Luc-SA-His₆). Проявление гелей выполняли с помощью красителя Кумасси

ния гибридного белка все-таки наблюдается его расщепление (рис. 2, образцы 1 и 2). Гибридные белки His₆-SA-Luc и Luc-SA-His₆ не содержали свободной люциферазы, поскольку His₆ связан с доменом стрептавидина (рис. 2, образцы 3 и 4).

Изучение состава и свойств гибридных белков.

Известно [13], что стрептавидин может существовать в форме различных олигомеров (димеров, тетрамеров, октамеров), обладающих способностью связывать биотин. Известны лишь единичные работы, в которых изучался олигомерный состав гибридных белков (стрептавидин-антитело), содержащих стрептавидин [19]. Важно было выяснить, с одной стороны, влияние домена люциферазы на олигомеризацию стрептавидина и его биотинсвязывающую активность, а с другой стороны, влияние структуры оли-

Люцифераза–стрептавидин

Свойства очищенных препаратов	Гибридные белки				Люцифераза
	SA-Luc-His ₆	SA-Luc-His ₆ M/G	His ₆ -SA-Luc	Luc-SA-His ₆	Luc
Активность × 10 ⁻¹² , RLU/мг	3,2±0,8	2,2±0,2	2,4±0,1	1,0±0,1	6,8±0,1
Выход, мг/200 мл среды	3,8±0,7	2,9±0,2	2,6±0,1	1,9±0,1	22,5±0,3
Связывание с колонкой, %	96 ± 3	86±4	77±1	35±5	89
Время полуинактивации при 47° (мин)	5±0,5	5±0,5	5±0,5	5±0,5	12,5±0,5
Максимум спектра биолюминесценции при pH 7,8 (нм)	595±5	595±5	595±5	595±5	595±5

гомера на ферментативную активность люциферазы. Выяснение взаимосвязи между структурой и свойствами гибридных белков люцифераза-стрептавидин было необходимо и для выбора гибридного белка с наилучшими характеристиками по активности люциферазы и стрептавидина.

Эксклюзионная хроматография очищенных металло-хелатной хроматографией препаратов гибридных белков люцифераза-стрептавидин (рис. 3) показала, что препараты содержат несколько фракций: мономеры, димеры, тетрамеры и высокомолекулярные олигомеры. Для каждой из полученных фракций были определены относительное содержание каждой фракции (рис. 4, а), удельная люциферазная активность (рис. 4, б) и способность связывать биотин (рис. 4, в). Оказалось, что SA-Luc-His₆ M/G и Luc-SA-His₆ образуют преимущественно высокомолекулярные фракции. Для SA-Luc-His₆ относительное содержание высокомолекулярных олигомеров и тетрамеров близко, а His₆-SA-Luc образует преимущественно тетрамеры. Для гибридных белков SA-Luc-His₆, His₆-SA-Luc и SA-Luc-His₆M/G максимальной удельной активностью люциферазы обладают тетрамеры, а для Luc-SA-His₆ – высокомолекулярные олигомеры. Содержание и удельная активность свободной люциферазы максимальны для SA-Luc-His₆, а для SA-Luc-His₆ M/G эти величины в ~2 раза ниже. Способность связываться с биотинилированным БСА, иммобилизованным на поверхности лунок планшета, была определена как отношение люциферазной активности исходного раствора гибридного белка. В качестве контроля использовали планшеты с иммобилизован-

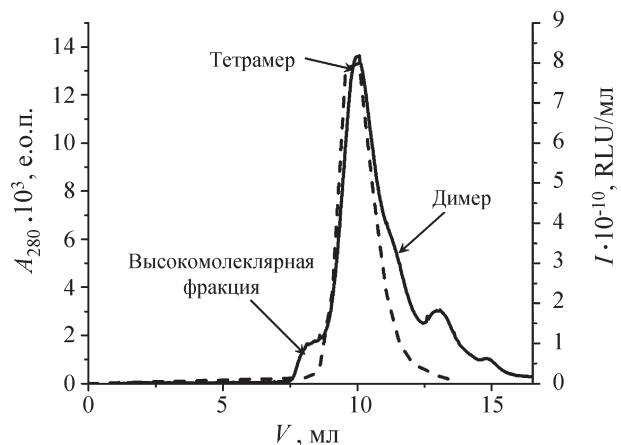


Рис. 3. Хроматограмма для His₆-SA-Luc на колонке Superose 12 10/30 GL (сплошная линия – оптическая плотность, пунктирная линия – биолюминесцентный сигнал фракции)

ным биотинилированным БСА (в данном случае связывание составляло менее 0,1%). Показано, что максимальной способностью связываться с биотином обладают фракции димеров и тетрамеров. Высокомолекулярные фракции связываются с биотином в четыре раза хуже, чем тетрамеры и димеры гибридных белков.

Влияние структуры плазмид на состав и свойства гибридных белков. Структура линкера между стрептавидином и люциферазой должна обеспечивать сохранение свойств двух соединяемых белков. Ранее в качестве линкеров для связывания легких и

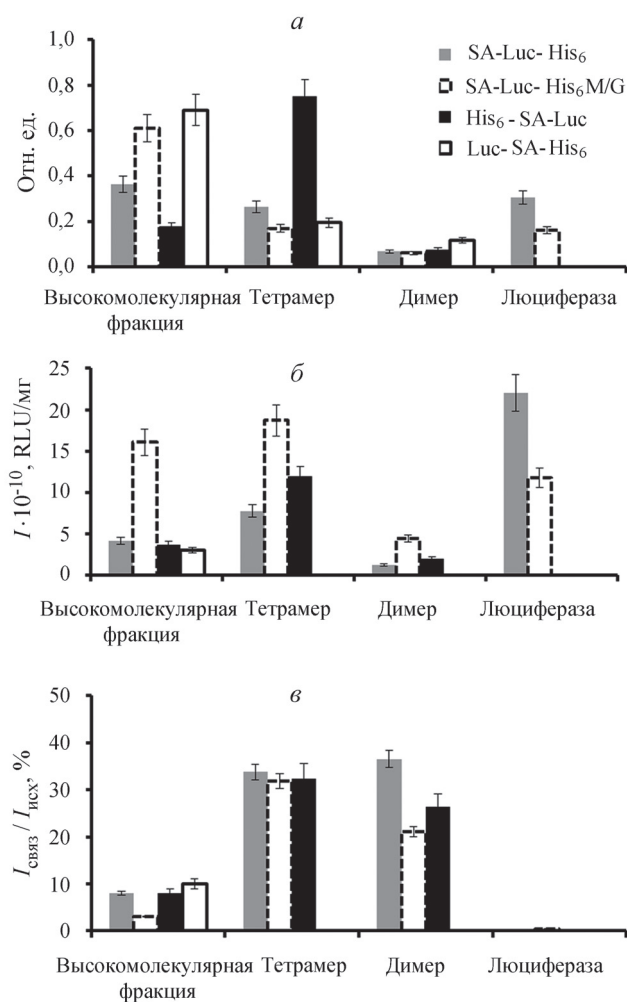


Рис. 4. Свойства различных форм гибридных белков люцифераза-стрептавидин: а – относительное содержание (отношение интегральной оптической плотности данной формы к суммарному интегралу оптической плотности для данного гибридного белка); б – удельная люциферазная активность (отношение максимальной интенсивности биолюминесценции к концентрации соответствующей формы белка, RLU/mg); в – способность связываться с биотином (отношение интенсивности биолюминесценции олигомерной формы, связанной с иммобилизованным биотинилированным БСА, к интенсивности биолюминесценции исходного раствора данной формы, %)

тяжелых цепей антител были использованы последовательности (GGGS)₃ [20] и SSA(DDAKK)₄DG [21]. В данной работе мы использовали более короткие подвижные линкеры, SSGGS и SGGGSA. Как показал хроматографический анализ продуктов, очищенных металло-хелатной хроматографией (рис. 4), при использовании плазмиды SA-Luc-His₆ около 30% белка, обладающего биолюминесцентной активностью, находилось в форме свободной люциферазы, причем именно люцифераза определяла активность получаемого препарата. Присутствие свободной люциферазы можно объяснить как ее коэкспрессией с гибридным белком, так и протеолитическим расщеплением последнего в процессе его наработки и получения лизата. Чтобы понять причину присутствия примеси свободной люциферазы и свести ее концентрацию к минимуму, мы получили дополнительно две плазмиды. В одной из которых стартовый остаток Met был заменен на Gly (SA-Luc-His₆M/G). Действительно, содержание свободной люциферазы в белке (SA-Luc-His₆M/G) уменьшилось в два раза, и в этом случае присутствие свободной люциферазы объяснялось именно протеолизом. В плазмиде (His₆-SA-Luc) последовательность His₆ была перемещена с С-конца гена люциферазы на N-конец гена стрептавидина. В этом случае при металло-хелатной хроматографии гибридный белок отделялся от всех компонентов, не

содержащих His₆, в том числе и от свободной люциферазы, если даже она и экспрессировалась. Белок Luc-SA-His₆, который кодировался плазмидой, содержащей ген стрептавидина на С-конце люциферазы и His₆ на С-конце стрептавидина, также не содержал свободной люциферазы.

Тетрамерные формы гибридных белков обладали наибольшей биолюминесцентной и биотинсвязывающей активностью (рис. 4, б, в), поэтому для них были получены спектры биолюминесценции и проведено измерение термостабильности. Добавление домена стрептавидина, как оказалось, не повлияло на спектры биолюминесценции, однако снизило термостабильность в два раза (таблица).

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что структура плазмиды существенно влияет на соотношение олигомерных форм, а так же на активность люциферазы и стрептавидина в составе гибридного белка. Плазмида His₆-SA-Luc является оптимальной для экспрессии гибридного белка люцифераза-стрептавидин, который образуется преимущественно в высокоактивной тетрамерной форме с высоким сродством к биотину, не содержит примесей активной свободной люциферазы и, следовательно, может быть использован в разработке аналитических систем, основанных на биолюминесцентной детекции.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 11-04-00698).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sano T., Cantor C.R. // *Biotechnology* 1991. **9**. P. 1378.
2. Albarran B., To R., Stayton P.S. // *Prot. Engin. Des. Selec.* 2005. **18**. P. 147.
3. Woodbury R.G., Irani M. // *US Patent* 2006/0246426. 02.11.2006.
4. Kopetzki E. // *US Patent* 6136564. 24.10.2000.
5. Hou J., Xu H., Hou H. // *CN Patent* 101531719. 16.09.2009.
6. Doleman L., Davies L., Rowe L. et al. // *Anal. Chem.* 2007. **79**. P. 4149.
7. Inouye S., Sato J.-i., Sasaki S., Sahara Y. // *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 2011. **75**. P. 568.
8. Wang Y., Yu Y., Shabahang S., Wang G., Szalay A. // *Mol. Gen. Genom.* 2002. **268**. P. 160.
9. Karp M., Lindqvist C., Nissinen R. et al. // *Biotechniques*. 1996. **20**. P. 20452.
10. Lamla T., Erdmann V.A. // *Prot. Expres. Purif.* 2004. **33**. P. 39.
11. Tatsumi H., Fukuda M. // *JP Patent* 7289264. 27.04.1994.
12. Nakamura M., Mie M., Funabashi H. et al. // *Biotechnol. Let.* 2004. **26**. P. 1061.
13. Bayer E.A., Ehrlich-Rogozinski S., Wilchek M. // *Electrophoresis*. 1996. **17**. P. 1319.
14. Кокушаров М.И., Угарова Н.Н. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер.2. Химия.* 2009. **50**. С. 23.
15. Devine J.H., Kutuzova G.D., Green V.A. et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. 1173. P. 121.
16. Кокушаров М.И., Угарова Н.Н. // *Биохимия.* 2008. **73**. С. 1071.
17. Koksharov M.I., Ugarova N.N. // *Prot. Engin. Des. Select.* 2011. **24**. P. 835.
18. Koksharov M.I., Lv C., Zhai X., Ugarova N.N. et al. // *Prot. Expres. Purif.* 2013. **90**. P. 186.
19. Huston J.S., Levinson D., Mudgett-Hunter M. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988. **85**. P. 5879.
20. Pantoliano M.W., Bird R.E., Johnson S. et al. // *Biochem J.* 1991. **30**. P. 10117.
21. Schultz J., Lin Y., Sanderson J. et al. // *Cancer Res.* 2000. **60**. P. 6663.

Поступила в редакцию 11.11.13

FUSION PROTEINS STREPTAVIDIN-LUCIFERASE. PREPARATION AND PROPERTIES.**D.V. Smirnova, M.I. Koksharov, I.N. Zorov, N.N. Ugarova***(chemical enzymology department, e-mail: S_mir_nova@mail.ru)*

Using genetic engineering methods we constructed four plasmids encoding fusion proteins of thermostable mutant (TS) *Luciola mingrelica* firefly luciferase (luc) and streptavidin (SA) with His₆ sequence on the N- or C- terminus of fusions: SA-Luc-His₆, His₆-SA-Luc, Luc-SA-His₆. The fusion proteins were expressed and isolated via metal-chelate chromatography. We studied their oligomeric composition, bioluminescent activity, thermostability, spectra of bioluminescence and biotin-binding ability. It was shown that the total bioluminescent activity of fusion Luc-SA-His₆ is 15%, and bioluminescent activity for other proteins is in range 35–50 % from activity of free luciferase TS. It was shown, that addition of SA domain has no influence on bioluminescent spectra of proteins, but lead to two time reduction of thermostability at 47°C. Size-exclusion chromatography showed that according to plasmid structure, fusions form different oligomeric compositions: dimeric, tetrameric and other high molecular weight aggregates, which distinguish by their enzyme activity and affinity to biotin. Fusion His₆-SA-Luc has the best properties.

Key words: firefly luciferase, *Luciola mingrelica*, fusion protein, streptavidin, oligomeric structure.

Сведения об авторах: Смирнова Дарья Васильевна – мл. науч. сотр. химического факультета МГУ (*S_mir_nova@mail.ru*); Кошкиarov Михаил Иванович – науч. сотр. химического факультета, канд. хим. наук; Зоров Иван Никитич – ст. науч. сотр. химического факультета, канд. хим. наук; Угарова Наталья Николаевна – глав. науч. сотр. химического факультета, докт. хим. наук (*nugarova@gmail.com*).