МОСКОВСКИЙ ОРДЕНА ЛЕНИНА, ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ И ОРДЕНА ОКТЯБРЬСКОЙ РЕВОЛЮЦИИ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени М.В. Ломоносова

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Carapo

ЗАХАРОВА Галина Сергеевна

АНИОННАЯ ПЕРОКСИДАЗА ТАБАКА: ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЕРМЕНТА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ КАК КОМПОНЕНТА БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) 03.01.04 – биохимия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научные руководители:

доктор химических наук, профессор В.И. Тишков

кандидат химических наук, А.А. Полозников

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ТОР	– анионная пероксидаза табака;
nTOP	– нативная анионная пероксидаза табака;
rTOP	– рекомбинантная анионная пероксидаза табака;
HRP	– пероксидаза хрена;
HRP C	 изоформа С пероксидазы хрена;
MnP	– марганец-пероксидаза;
LiP	– лигнин-пероксидаза;
CcP	– цитохром <i>с</i> пероксидаза;
SPP	– пероксидаза батата;
BSA	– бычий сывороточный альбумин;
PEG	– полиэтиленгликоль;
DEAE-сефароза	– диэтиламиноэтанол сефароза;
ABTS	- 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) аммония;
DTT	– дитиотреитол;
GSSG	– окисленный глутатион;
IPTG	– изопропил-β-D-тиогалактопиранозид;
SDS	– додецилсульфат натрия;
RZ	- Reinheitszahl, отношение поглощений на 403 нм и 280 нм
	$(A_{403}/A_{280});$
TEMED	<i>– N,N,N',N'</i> -тетраметилэтилендиамин;
TMB	– 3,3',5,5'-тетраметилбензидин;
CLIA	 – хемилюминесцентный иммуноанализ;
IgG	– иммуноглобулины класса G;
IgA	 иммуноглобулины класса А;
IgM	– иммуноглобулины класса М;
HRP-IgG	– конъюгат нативной пероксидазы хрена с иммуноглобулинами
	класса G;

rTOP-IgG – конъюгат рекомбинантной пероксидазы табака дикого типа с иммуноглобулинами класса G;

rTOP-F140Y-IgG – конъюгат мутантной формы рекомбинантной пероксидазы табака rTOP-F140Y с иммуноглобулинами класса G;

SATA – N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат;

- SMCC сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1карбоксилат;
- sulfo-SMCC сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1карбоксилат;
- NHS N-гидроксисукцинимид;
- sulfo-NHS N-гидроксисульфосукцинимид натрия;
- ЕDAC 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид;
- GAM-IgG поликлональные иммуноглобулины класса G козы к иммуноглобулинам мыши;
- ДМФА *N,N*-диметилформамид;
- ЕDTA динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты;
- EGTA этиленгликоль тетрауксусная кислота;
- PBS натрий-фосфатный буфер;
- 2-IT 2-иминотиолан;
- СВЭ стандартный водородный электрод.

ОГЛАВЛЕНИЕ

1.	BBE	ДЕНИЕ	8
2.	ОБЗС	ОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
	2.1.	Структура и свойства пероксидазы табака	13
		2.1.1. Классификация пероксидаз. Общие сведения о пероксидазе табан	ka
			13
		2.1.2. Механизм катализа ферментов из суперсемейства «растительн	ых»
		пероксидаз	18
		2.1.3. Инактивация гем-содержащих пероксидаз пероксидом водорода	21
		2.1.4. Хемилюминесцентная реакция оксиления люминола	23
	2.2.	Влияние ионов кальция на свойства пероксидаз	27
	2.3.	Экспрессия и рефолдинг рекомбинантной пероксидазы табака	34
		2.3.1. Методы <i>in vitro</i> ренатурации рекомбинантных бели	ков,
		экспрессирующихся в виде телец включения	35
		2.3.2. Рефолдинг белков методом разведения	36
		2.3.3. Рефолдинг белков с использованием диализа	40
		2.3.4. Хроматографические методы рефолдинга белков	40
		2.3.5. Рефолдинг при высоком гидростатическом давлении	43
	2.4.	Использование пероксидазы табака в качестве ферментной метки	для
	ИММ	уноанализа	45
		2.4.1. Ферментные метки в иммуноанализе	46
		2.4.2. Методы конъюгации ферментов с антителами	49
		2.4.3. Использование SMCC и sulfo-SMCC для модификации белков	51
		2.4.4. Использование SATA для модификации белков	53
	2.5.	Применение пероксидазы табака для создания биосенсоров	55

3. ЭКСІ	ТЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ)
3.1.	Материалы)
3.2.	Методы)
	3.2.1. Трансформация клеток <i>E. coli</i> BL21(DE3)CodonPlus/pLysS и <i>E. col</i> BL21(DE3)Rosetta/pLysS плазмидной ДНК	<i>i</i> 0
	3.2.2. Модификация условий культивирования штаммов <i>E.col</i> BL21(DE3)CodonPlus/pLysS и <i>E.coli</i> BL21(DE3)Rosetta/pLysS - продуцентов рекомбинантной пероксидазы табака	<i>i</i> - 1
	3.2.3. Экспрессия пероксидазы табака в клетках E.col BL21(DE3)CodonPlus/pLysS 62	'i 2
	3.2.4. Выделение и солюбилизация телец включения	2
	3.2.5. Оптимизация условий рефолдинга рекомбинантной пероксидазь табака	л З
	3.2.6. Рефолдинг рекомбинантной пероксидазы табака при оптимальных условиях	x 5
	3.2.7. Очистка ренатурированной пероксидазы табака	5
	3.2.8. Электрофорез в полиакриламидном геле	5
	3.2.9. Определение концентрации белка	7
	3.2.10. Фотометрическое определение активности пероксидазы табака 67	7
	3.2.11. Реакция окисления люминола	3
	3.2.12. Влияние ионов кальция на свойства рекомбинантной пероксидазь табака	л З
	3.2.13. Конъюгация антител и рекомбинантной пероксидазы табака о использованием SATA и sulfo-SMCC	c 9

	3.2.14. Изучение влияния модификации рекомбинантной пероксидазы
	табака с использованием sulfo-SMCC на активность фермента по
	отношению к люминолу
	3.2.15. Иммуноанализ с использованием конъюгатов рекомбинантной
	пероксидазы табака с антителами70
	3.2.16. Иммобилизация рекомбинантной пероксидазы табака на электроде
	3.2.17. Определение электрохимических параметров биосенсоров на
	основе рекомбинантной пероксидазы табака72
4. PE3y	ЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ
4.1.	Модификация условий экспрессии рекомбинантной пероксидазы табака 73
4.2.	Оптимизация условий рефолдинга рекомбинантной пероксидазы табака
дик	ого типа методом разведения78
	4.2.1. Влияние концентрации окисленного глутатиона и дитиотреитола на
	выход активной пероксидазы табака при рефолдинге
	4.2.2. Влияние рН на эффективность рефолдинга пероксидазы табака 81
	4.2.3. Влияние концентрации белка на эффективность рефоллинга
	пероксидазы табака
	4.2.4. Влияние концентрации мочевины на эффективность рефолдинга
	пероксидазы табака
	4.2.5. Влияние концентрации хлорида кальция на выход активного
	фермента при рефолдинге пероксидазы табака
	4.2.6. Влияние концентрации гемина и времени его добавления на
	эффективность рефолдинга пероксидазы табака
	4.2.7. Влияние времени солюбилизации телец включения на
	эффективность рефолдинга пероксидазы табака

4.2.8. Оптимизированные условия проведения рефолдинга пероксидазы
табака
4.2.9. Рефолдинг пероксидазы табака с использованием гель-фильтрации
4.3. Наработка и очистка рекомбинатной пероксидазы табака
4.4. Влияние ионов кальция на свойства рекомбинантной пероксидазы табака
4.5. Рекомбинантная пероксидаза табака как ферментная метка для
иммуноанализа101
4.5.1. Получение конъюгатов рекомбинантной пероксидазы табака с
антителами
4.5.2. Влияние модификации пероксидазы табака с использованием sulfo-
SMCC на активность по отношению к люминолу105
4.5.3. Иммуноферментный анализ с использованием конъюгатов
рекомбинантной пероксидазы табака с антителами 106
4.6. Влияние метода иммобилизации на электрокаталитическую активность
рекомбинантной пероксидазы табака113
5. ВЫВОДЫ
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. ВВЕДЕНИЕ

Анионная пероксидаза табака (ТОР, КФ 1.11.1.7) – это гем-содержащий фермент, относящийся к III классу суперсемейства пероксидаз растительного и грибного происхождения. Нативная ТОР – это мономерный гликопротеин, состоящий из двух доменов (дистального и проксимального по отношению к плоскости гема), структура которого поддерживается четырьмя дисульфидными связями и двумя кальций-связывающими сайтами (по одному в каждом домене). ТОР катализирует окисление различных ароматических электрондонорных субстратов под действием пероксида водорода.

Среди ферментов, входящих в III класс растительных пероксидаз, наиболее хорошо изученным является изофермент С пероксидазы из корней хрена (HRP C). Этот фермент широко применяется на практике, в первую очередь в различных биоаналитических целях (в качестве метки для иммуноанализа, как компонент биосенсоров и т.д.). К достоинствам HRP C относятся ее относительная дешевизна, доступность, довольно высокая стабильность и относительно небольшой размер молекулы (последний фактор является важным параметром при получении иммуноконъюгатов для иммуногистохимического и иммуноцитохимического окрашивания). Тем не менее, данный фермент не лишён ряда существенных недостатков, которые накладывают ограничения на его использование. К таким недостаткам, в первую очередь, относятся невысокая стабильность к инактивации пероксидом водорода, низкая эффективность прямого переноса электронов между активным центром фермента и поверхностью электрода в биосенсорах и низкая активность в хемилюминесцентной реакции окисления люминола.

Проведенные в нашей лаборатории исследования показали, что ТОР превосходит HRP по многим параметрам. Однако практическое применение фермента напрямую зависит от возможности получать его в больших количествах. Так как выход активной ТОР при выделении из природного источника (*Nicotiana tabacum*) не превышал 5 мг с 1 кг листьев, в нашей лаборатории была создана система экспрессии рекомбинантного фермента в клетках *Escherichia coli*. В

- 8 -

результате был получен штамм *E. coli* с высоким уровнем экспрессии рекомбинантной TOP (около 45 % от суммарного клеточного белка). Но так как фермент в клетках *E. coli* экспрессировался в виде нерастворимых телец включения, для получения активной TOP была также разработана методика ренатурации (рефолдинга) фермента *in vitro*. Данная методика позволила получить достаточное количество фермента для изучения основных свойств, однако эффективность рефолдинга была невысока (выход активной TOP – около 3-10% от денатурированного апо-фермента). Поэтому одной из основных задач данной работы стала оптимизация условий ренатурации TOP для повышения выхода активного фермента. Помимо практического значения изучение влияния различных параметров на эффективность рефолдинга TOP несомненно представляет и научный интерес, так как накопление данных в этой области позволит выявить фундаментальные основы протекания рефолдинга рекомбинантных белков в целом.

Основным применением пероксидаз на сегодняшний день является использование их в качестве ферментной метки. Меченные HRP C антитела применяются в различных иммунохимических методах, в первую очередь, в иммуноферментном анализе. Высокая чувствительность ферментных меток в совокупности со специфичностью реакции антитело-антиген делает возможным определение различных аналитов в сложных смесях с высокой точностью. Востребованность данного типа детектирующих систем во множестве областей (медицине, контроле качества продуктов, мониторинге состояния окружающей среды и др.) делает актуальным поиск путей улучшения характеристик иммуноанализа, в том числе посредством поиска новых ферментных меток. Несмотря на то, что свойства ТОР, обеспечивающие перспективность её использования для иммуноанализа (например, для создания хемилюминесцентных иммуноферментных тест-систем большое значение имеет высокая активность ТОР реакции окисления люминола, значительно превосходящая В активность применяющейся на практике HRP C), были достаточно подробно изучены,

- 9 -

конъюгаты ТОР с антителами получены не были. Поэтому второй задачей данной работы стало создание конъюгатов антител с ТОР и сравнение их с аналогичными, но содержащими в качестве метки HRP C, при проведении иммуноферментного анализа с колориметрической и хемилюминесцентной детекцией.

Ещё одним важным применением для различных оксидоредуктаз является их использование для создания биосенсоров. В последнее время большое внимание уделяется изучению т.н. безреагентных биосенсоров, основанных на прямом переносе электронов между активным центром фермента и поверхностью электрода. Прямой перенос электронов был показан лишь для небольшого числа ферментов, в том числе для HRP C. Ранее в нашей лаборатории наличие прямого переноса электронов было показано и для ТОР. При этом ТОР более стабильна к инактивации пероксидом водорода, характеризуется большей эффективностью и скоростью прямого переноса электронов, а также обеспечивает более широкий линейный диапазон определения концентрации пероксида водорода по сравнению с HRP C. Однако в работах по изучению электрохимических свойств ТОР для иммобилизации фермента на поверхности электрода использовался метод физической адсорбции, который, как известно, может приводить к значительным конформационным изменениям в структуре фермента и его денатурации. В этой связи большой интерес представляет изучение влияния других способов иммобилизации рекомбинантной ТОР на поверхности электродов с целью улучшения электрокаталитических свойств фермента и характеристик биосенсора в целом. Поэтому ещё одной задачей данного исследования было изучение влияния химической иммобилизации ТОР с использованием карбодиимидного метода на параметры безреагентного биосенсора.

Научная новизна. В ходе выполнения данной работы впервые было систематическое изучение влияния проведено различных параметров на эффективность ренатурации рекомбинантной TOP in vitro. Показано, что наибольшее влияние на выход активной ТОР при рефолдинге из телец включения апо-фермента в рефолдинг-среде. оказывает концентрация Впервые для

- 10 -

рефолдинга рекомбинантной пероксидазы был использован метод гельфильтрации. Сравнение двух методов рефолдинга (метода разведения и гельфильтрации) показало, что рефолдинг ТОР на гель-фильтрационной колонке значительно менее эффективен. Изучено влияния ионов кальция на протекание рефолдинга и на свойства рекомбинантной ТОР. Показано, что инкубация фермента в присутствии ионов кальция приводит к снижению каталитической активности по отношению к различным ароматическим субстратам. Впервые показан стабилизирующий эффект ионов кальция при термоинактивации ТОР. Подобран метод и синтезированы конъюгаты ТОР с антителами, которые были использованы для проведения иммуноанализа. Показано, что модификация аминогрупп ТОР в процессе конъюгации не приводит к падению активности фермента. Впервые изучено влияние химической иммобилизации на электрохимические свойства ТОР. Показано, что ковалентная иммобилизация ТОР на поверхности графитового электрода позволяет существенно повысить отклик биосенсора и операционную стабильность фермента.

Практическая значимость работы. Оптимизация условий проведения рефолдинга рекомбинантной ТОР позволила значительно увеличить выход активного фермента, что крайне важно с точки зрения возможности практического применения. Показано, что использование конъюгатов антител с рекомбинантной ТОР дикого типа и мутантной формой ТОР-F140Y приводит к повышению интенсивности сигнала при проведении иммуноанализа как с колориметрической регистрацией, так и с детекцией по хемилюминесценции. а также обеспечивает большую чувствительность анализа. Было достигнуто существенное улучшение характеристик безмедиато р-но-го биосенсора на основе ТОР (в частности, интенсивности электрокаталитического сигнала, операционной стабильности иммобилизо¬ван-ного фермента и ширины линейного диапазона определения пероксида водорода) при применении нового протокола химической иммобилизации фермента на поверхности графитового электрода.

- 11 -

Апробация работы. Основные результаты исследования были представлены на следующих международных конгрессах, конференциях и школах: VII и VIII Московский международный конгресс "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, Россия, 2013 и 2015), XIV Международная конференция молодых ученых «Леса Евразии» (Вологда, Россия, 2014), International BioForum-2014 (Пущино, Россия, 2014), 10th International Conference on Protein Stabilization (Стреза, Италия, 2014), International Conference OxiZymes (Вена, Австрия, 2014), XXI International Conference INPEC-2014 (International Network of Protein Engineering Centers) (Санкт-Петербург, Россия, 2014), International Conference "Biocatalysis 2015: Fundamentals and Applications" (Московская область, Россия, 2015).

По материалам диссертационной работы опубликовано 12 печатных работ: 3 статьи (все журналы входят в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ) и 9 тезисов докладов.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 159 страницах и содержит 70 рисунков, 9 таблиц и 260 ссылок.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Структура и свойства пероксидазы табака

2.1.1. Классификация пероксидаз. Общие сведения о пероксидазе табака

Пероксидазы (КФ 1.11.1.Х) относятся к ферментам класса оксидоредуктаз и катализируют окисление широкого спектра субстратов под действием пероксида водорода. Пероксидазы подразделяются на содержащие и не содержащие гем. Гемсодержащие пероксидазы включают каталазы (КФ 1.11.1.6), галопероксидазы (КФ 1.11.1.8, 1.11.1.10 и 1.11.1.18), двухгемовые цитохром с пероксидазы (КФ 1.11.1.5) и два больших суперсемейства «животных» (включает пероксидазы животных, грибов и бактерий) и «растительных» пероксидаз (включает пероксидазы растений, грибов и бактерий) [1]. В свою очередь последнее суперсемейство подразделяют на три класса: в I класс входят аскорбатпероксидаза (КФ 1.11.1.1), цитохром *с* пероксидаза (С*с*Р; КФ 1.11.1.5) и каталаза-пероксидаза (КФ 1.11.1.21); во II класс входят лигнин-пероксидаза (LiP; КФ 1.11.1.14), марганец-пероксидаза (MnP; КФ 1.11.1.13) и полифункциональная («versatile») пероксидаза (КФ 1.11.1.16); III класс образуют классические пероксидазы растений (КФ 1.11.1.7) (рис. 2.1). Приведённое разделение пероксидаз неживотного происхождения на три класса было предложено в 1992 году Карен Велиндер (Karen Welinder) [2] на основании анализа аминокислотных последовательностей данных ферментов. Впоследствии такая классификация была подкреплена данными рентгеноструктурного анализа.



Рис. 2.1. Классификация пероксидаз [1].

Вторичную структуру «растительных» пероксидаз обычно формируют 10-13 α-спиралей, в то время как β-тяжи представлены слабо. В большинстве случаев в молекуле различают два структурных домена, между которыми в гидрофобном кармане расположена простетическая группа – гем (комплекс железа с протопорфирином IX) [3].

I класс «растительных» пероксидаз включает внутриклеточные ферменты прокариотического происхождения, локализованные в митохондриях и пластидах. Они не гликозилированы и не содержат ни дисульфидных связей, ни ионов кальция. Секретируемые грибные пероксидазы, относящиеся ко II классу, являются мономерными гликопротеидами (доля олигосахаридов – около 5 %) и для них характерно наличие четырёх дисульфидных связей и двух консервативных кальций-связывающих доменов. Наиболее хорошо изученные представители этого класса – лигнин-пероксидаза и марганец-пероксидаза, принимающие участие в

in vivo окислении лигнина, а также пероксидаза из *Coprinus cinereus* (навозник обыкновенный). Ферменты III класса (секретируемые растительные пероксидазы) также являются мономерными гликопротеидами, имеют четыре дисульфидные связи и два кальций-связывающих центра. Однако расположение дисульфидных связей и «укладка» полипептидной цепи в пероксидазах II и III классов несколько различаются.

В настоящее время известны трёхмерные структуры 8 пероксидаз из III класса суперсемейства растительных пероксидаз: пероксидазы хрена (PDB: 1ATJ), пероксидазы сои (PDB: 1FHF), пероксидазы ячменя (PDB: 1BGP), двух изоформы (анионной и нейтральной) пероксидазы из *Arabidopsis thaliana* (PDB: 1PA2 и 1QGJ), пероксидазы арахиса (PDB: 1SCH), пероксидазы редьки (PDB: 4A5G), пероксидазы пальмы (PDB: 3HDL) и пероксидазы фикуса (PDB: 1CUO). Наиболее хорошо изученной является пероксидаза из корней хрена (HRP) и во многом она рассматривается как модельный фермент для III класса «растительных» пероксидаз.

Анионная пероксидаза табака (TOP) также относится к III классу «растительных» пероксидаз. Нативная гликозилированная ТОР, выделенная из листьев Nicotiana tabacum, имеет массу около 36 кДа и pI = 3.5[4]. Аминокислотная последовательность фермента была определена в 1987 году Марком Лагримини (Mark Lagrimini) с соавт. [5]. Было показано, что фермент синтезируется в виде белка-предшественника, включающего сигнальный пептид длиной 22 аминокислотных остатка и основную часть длиной 302 аминокислотных остатка, последовательность которой представлена на рис. 2.2. Масса белковой части ТОР без сигнального пептида составляет 32,3 кДа. Таким образом, доля 10 %. олигосахаридов В нативном ферменте составляет около Анализ аминокислотной последовательности выявил 4 «классических» сайта гликозилирования Asn-X-Ser/Thr (где X – любая аминокислота, кроме Pro): Asn13-Val14-Thr15, Asn128-Arg129-Ser130, Asn185-Gly186-Ser187, Asn283-Ile284-Ser285 и ещё 2 сайта типа Asn-X-Cys (в ряде исследований было показано, что по сайтам

- 15 -

данного типа также часто осуществляется гликозилирование *in vivo* [6]): <u>Asn47</u>-Gly48-Cys49 и <u>Asn87</u>-Val88-Cys89.

1-QLSATFYDTT CPNVTSIVRG VMDQRQRTDA RAGAKIIRLH FHDCFVNGCD-50 51-GSILLDTDGT QTEKDAPANV GAGGFDIVDD IKTALENVCP GVVSCADILA-100 101-LASEIGVVLA KGPSWQVLFG RKDSLTANRS GANSDIPSPF ETLAVMIPQF-150 151-TNKGMDLTDL VALSGAHTFG RARCGTFEQR LFNFNGSGNP DLTVDATFLQ-200 201-TLQGICPQGG NNGNTFTNLD ISTPNDFDND YFTNLQSNQG LLQTDQELFS-250 251-TSGSATIAIV NRYAGSQTQF FDDFVSSMIK LGNISPLTGT NGQIRTDCKR-300 301-VN

Рис. 2.2. Аминокислотная последовательность rTOP.

После того, как М. Лагримини с соавт. было проведено клонирование гена top [7], стало возможно получить рекомбинантный фермент. В 2003 году в нашей лаборатории была разработана система экспрессии TOP в клетках E. coli, а также процедура её рефолдинга и очистки. В результате была получена рекомбинантная негликозилированная ТОР (rTOP) [8]. Позднее была осуществлена кристаллизация rTOP и определена её трёхмерная структура (данные не опубликованы). Данные рентгеноструктурного анализа показали, что в структуре фермента, как и у других известных пероксидаз III класса, преобладают α-спирали (15 α-спиралей и 2 βтяжа), которые образуют два домена: дистальный и проксимальный по отношению плоскости гема (рис. 2.3). Конформация фермента поддерживается 4 к дисульфидными связями (между остатками Cys 11-89, 44-49, 95-298, 174-206) и двумя кальций-связывающими сайтами (более подробно их строение и роль будет рассмотрена в разделе 2.2). В гидрофобном кармане между двумя доменами расположена простетическая группа – гем (комплекс трёхвалентного железа с протопорфирином IX, рис 2.4). Ион железа находится в пятикоординационном состоянии (четыре связи – внутри гема и одна – с атомом азота NE2 проксимального остатка His167).



Рис. 2.3. Трёхмерная структура гТОР.



Рис. 2.4. Структура гема (на рисунке указана нумерация атомов углерода согласно номенклатуре IUPAC).

2.1.2. Механизм катализа ферментов из суперсемейства «растительных» пероксидаз

Пероксидазы катализируют окисление различных электрон-донорных субстратов под действием пероксида водорода. В качестве субстратов могут выступать следующие соединения: фенолы, ароматические амины, индолы и сульфонаты, а также иодид-, тиоцианат- и бисульфит-ионы. Окисление последних возможно только при их связывании непосредственно в активном центре фермента и происходит за счёт прямого переноса феррильного кислорода на субстрат [9–12]. В этом случае ферментативный цикл включает две стадии: сначала в результате взаимодействия с пероксидом водорода происходит окисление атома железа и образование π-катион-радикала на порфирине (то есть образуется т.н. Соединение I), после чего в результате двухэлектронного восстановления фермент возвращается в исходную форму [13]. Схематически данный процесс можно представить следующим образом:

POD + $H_2O_2 \rightarrow$ Соединение I + H_2O_2 ,

Соединение I + X⁻ + H⁺ \rightarrow POD + HOX + H₂O,

где POD – ферри-форма пероксидазы, X⁻ – субстрат.

Окисление ароматических субстратов в основном происходит при их связывании вблизи активного центра фермента. Для HRP C с помощью сайтнаправленного мутагенеза было определено, что ароматические субстраты связываются в области Phe179 [14]. В то же время некоторые субстраты (такие как ABTS и индол-3-уксусная кислота) окисляются по цепи переноса электронов. Окисление ароматических субстратов протекает в три этапа (рис. 2.5). На первом этапе образуется Соединение I. После взаимодействия с первой молекулой электрон-донорного субстрата происходит восстановление Соединения I до промежуточного Соединения II, в котором только атом железа находится в окисленной форме. После восстановления ещё одной молекулой электрондонорного субстрата фермент возвращается в исходную ферри-форму.



Рис. 2.5. Каталитический цикл гем-содержащих пероксидаз [15].

Упрощенная схема реакции выглядит следующим образом:

 $POD + H_2O_2 \rightarrow Coединение I + H_2O$

Соединение I + $AH_2 \rightarrow Coeдинениe II + AH^{\bullet}$

Соединение II + $AH_2 \rightarrow POD + AH' + H_2O$

 $2AH^{\bullet} \rightarrow A_2H_2$

где POD – ферри-форма пероксидазы, АH₂ – электрон-донорный субстрат, АН[•] - радикальный продукт окисления субстрата.

Конечными продуктами окисления ароматических аминов и фенолов являются олигомеры и полимеры, так как их димеры в свою очередь также являются субстратами пероксидаз.

Так как первой была определена трёхмерная структура дрожжевой С*с*Р [16– 18], образование Соединения I также вначале было подробно изучено на её примере. Позднее множество данных было также получено для HRP C. Механизм образования Соединения I был предложен ещё в 1980 году Poulos и Kraut [19]. Схематическое изображение образования Соединения I с участием каталитических остатков His42 и Arg38 на примере HRP C приведено на рис. 2.6. После присоединения пероксида водорода к атому железа протон от O_{α} (связанного с железом) переходит на дистальный остаток His42. Образуется система водородных связей между дистальным остатком His42, атомом пероксида O_{β} (не связанным с

- 19 -

железом) и дистальным остатком Arg38. Положительно заряженный остаток Arg38 стабилизирует отрицательный заряд на пероксиде. Переход протона от His42 к O₆ приводит к гетеролитическому расщеплению связи О-О и образованию H₂O (в случае H_2O_2) и Соединения I. О важности дистальных остатков Arg и His говорит и тот факт, что они являются консервативными для всего суперсемейства «растительных» пероксидаз. Критическая была роль данных остатков подтверждена в результате экспериментов по сайт-направленному мутагенезу СсР [20,21]. После получения рекомбинантной HRP C [22] и определения её трёхмерной структуры [23] для неё были проведены аналогичные эксперименты по области сайт-направленному мутагенезу В активного центра [24-31],подтвердившие сделанные ранее выводы.



Рис. 2.6. Механизм образования Соединения I [32].

В присутствии электрон-донорных субстратов Соединение I как правило в две стадии (через образование Соединения II) восстанавливается до исходного состояния. Механизм окисления субстратов на примере феруловой кислоты, которая является *in vivo* субстратом пероксидаз, представлен на рис. 2.7. Данный механизм был предложен на основании данных рентгеноструктурного анализа комплекса HRP C с феруловой кислотой (PDB: 6ATJ) [33].



Рис. 2.7. Механизм восстановления Соединения I и Соединения II для HRP C в присутствии феруловой кислоты [34].

2.1.3. Инактивация гем-содержащих пероксидаз пероксидом водорода

Добавление избытка пероксида водорода приводит к инактивации пероксидаз, которая может быть как обратимой, так и нет [35]. В отсутствии электрон-донорных субстратов происходит образование т.н. Р-940 (данная форма имеет характерную полосу поглощения при 940 нм), которое затем переходит в Р-670 [36]. Если же электрон-донорные субстраты присутствуют в реакционной смеси, Соединение I может реагировать как с ними (восстанавливаясь до Соединения II и далее до исходного состояния), так и с пероксидом водорода. Поэтому количество циклов до окончательной инактивации фермента напрямую зависит от соотношения концентраций субстрат - пероксид водорода. Таким образом, наличие субстрата защищает фермент от инактивации [35,37–39] благодаря более высокой реакционной способности ароматических субстратов по отношению к Соединению I и Соединению II.

В отсутствии же электро-донорных субстратов протекает множество более медленных реакций. После взаимодействия активного центра фермента с первой молекулой пероксида водорода и образования Соединения I может происходить перенос электрона с полипептидной цепи на порфирин-радикал с образованием Соединения I*(рис. 2.8). Как правило, данная реакция протекает медленно (исключение составляют лигнин-пероксидазы и каталазы-пероксидазы [40,41]). Благодаря высокой окислительной способности Соединения I пероксид водорода может выступать в качестве донора электронов, в результате чего Соединение I переходит в Соединение II с образованием супероксид-иона, однако данная реакция протекает очень медленно и лишь в редких случаях. Возможна и необратимая инактивация фермента из-за образования Р-670 в результате окисления Соединения I пероксидом водорода. Соединение I* или Соединение II также могут взаимодействовать с молекулой H₂O₂, переходя в Соединение III* и Соединение III, соответственно [40,42]. Соединение III является относительно стабильным и медленно разлагается до исходной ферри-формы фермента с выделением супероксид-иона (при этом скорость реакции увеличивается с повышением pH) [40,42]. $O_2^{\bullet-}$ может реагировать с ферри-формой фермента, приводя к образованию Соединения III, а также с Соединением II, приводя к образованию ферри-формы фермента. Соединение III также может переходить в

ферро-форму фермента, которая далее может быть окислена пероксидом водорода до Соединения II.



Рис. 2.8. Схема образования различных промежуточных форм фермента при инкубации гем-содержащих пероксидаз в присутствии избытка пероксида водорода и в отсутствии электрондонорных субстратов [36].

Таким образом, очевидно, что взаимодействие гем-содержащих пероксидаз с пероксидом водорода представляет собой комплексный процесс, в котором обратимая инактивация превалирует над необратимой, что обеспечивает достаточно высокую устойчивость этих ферментов к H₂O₂.

2.1.4. Хемилюминесцентная реакция оксиления люминола

Пероксидазы способны окислять также хемилюминесцентные субстраты. Это свойство имеет большое практическое значение и используется в различных вариантах иммуноферментного анализа, при проведении вестерн-блота и в иммуногистохимических исследованиях. В частности, для HRP C (коммерчески доступной и наиболее часто использующейся в качестве ферментной метки при проведении иммуноанализа) разработана и применяется на практике система детекции с использованием хемилюминесцентного субстрата люминола (гидразид 3-аминофталевой кислоты). В щелочной среде в присутствии различных катализаторов из люминола образуется 3-аминофталат в возбуждённом состоянии, который при переходе в основное состояние излучает свет с длиной волны 425 нм (рис. 2.9).



Рис. 2.9. Реакция окисления люминола под действием пероксида водорода в щелочной среде, катализируемая пероксидазой (POD).

При этом схема катализа выглядит так же, как для других ароматических субстратов:

$POD + H_2O_2 \rightarrow Coeдинение I + H_2O$	(k_l)
Соединение I + LH ⁻ \rightarrow Соединение II + L ⁻	(k_2)
Соединение II + LH ⁻ \rightarrow POD + L ⁻ + H ₂ O	(k_3)

где POD – ферри-форма пероксидазы, LH⁻ и L⁻ - люминол и радикальный продукт его окисления, соответственно.

Так как скорость-лимитирующей в случае HRP C является стадия восстановления Соединения II (*k*₃), для повышения чувствительности определения в реакционную смесь вносят т.н. «усилители хемилюминесценции» – соединения с

более высоким значением k_3 по сравнению с люминолом. В качестве усилителей могут выступать различные фенолы, фенотиазины, ароматические амины, индофенолы, нафтолы и другие соединения [43–47]. Хемилюминесцентная реакция в присутствии усилителей получила название реакции усиленной хемилюминесценции. Её механизм является комплексным и многостадийным и включает также стадии окисления усилителя хемилюминесценции:

 $POD + H_2O_2 \rightarrow Coединение I + H_2O$

Соединение I + E \rightarrow Соединение II + E[•]

Соединение II + E \rightarrow POD + E[•] + H₂O

 $\mathrm{E}^{\bullet} + \mathrm{L}\mathrm{H}^{-} \leftrightarrow \mathrm{E} + \mathrm{L}^{\bullet-}$

где POD – ферри-форма пероксидазы, Е и Е[•] - усилитель и радикальный продукт его окисления, соответственно; LH⁻ и L^{•-} - люминол и радикальный продукт его окисления, соответственно.

Последняя реакция является обратимой и смещение равновесия зависит от разности восстановительных потенциалов пар L^{•-}/LH⁻ и E[•]/E.

Помимо перечисленных выше в реакционной смеси также протекают различные неферментативные реакции:

$$2 L^{\bullet} \rightarrow L + LH^{\bullet}$$

$$L + H_2O_2 \rightarrow LO_2^{2\bullet}$$

$$L^{\bullet} + O_2 \rightarrow L + O_2^{\bullet}$$

$$L^{\bullet} + O_2^{\bullet} \rightarrow LO_2^{2\bullet}$$

$$LO_2^{2\bullet} \rightarrow (AP^{2\bullet})^* + N_2$$

$$(AP^{2\bullet})^* \rightarrow AP^{2\bullet} + hv$$

где L⁻ – радикальный продукт окисления люминола; L – окисленная форма люминола; LO₂²⁻ – эндопероксид люминола; (AP²⁻)^{*} – 3-аминофталат в возбуждённом состоянии; AP²⁻ – 3-аминофталат.

Изучение свойств нативной ТОР выявило очень высокую активность данного фермента по отношению к люминолу: так, интенсивность люминесценции при проведении реакции в присутствии нативной ТОР и отсутствии усилителей на порядок превосходила интенсивность люминесценции, достигаемую в реакции усиленной хемилюминесценции для HRP C (в качестве усилителя выступал *n*йодфенол) [48]. Также было обнаружено, что интенсивность хемилюминесценции для ТОР при проведении реакции в анаэробных условиях падает примерно на 30 %, что говорит о значительной роли окисления супероксидом. Но наиболее важным открытием стали очень близкие значения кинетических констант ферментативного окисления люминола ($k_1 = 4.9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1}$, $k_2 = 7.6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1}$, $k_3 = 2.1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1}$ при pH 9,3), что выделяет ТОР среди других растительных пероксидаз, для которых значение k_2 превышает значение k_3 минимум на порядок. Важным преимуществом ТОР является и способность сохранять активность в присутствии высоких концентраций H₂O₂. Полученные при изучении нативной TOP данные говорят о стабильности её Соединения I, а также о высокой реакционной способности Соединения II по отношению к люминолу. Ещё одним преимуществом rTOP является более высокое соотношение сигнал-шум по сравнению с реакцией усиленной хемилюминесценции, катализируемой HRP C. Всё вышесказанное говорит о перспективности использования ТОР в качестве ферментной метки для иммуноанализа.

После того, как в нашей лаборатории была получена рекомбинантная ТОР [8], а также её мутантная форма rTOP-F140Y [49], было проведено изучение их каталитических свойств в хемилюминесцентной реакции окисления люминола [50]. Исследование показало, что как фермент дикого типа, так и rTOP-F140Y проявляли высокую активность по отношению к люминолу, при этом интенсивность люминесценции была выше примерно на два порядка по сравнению с HRP C. Хотя rTOP-F140Y обеспечивала мутантная форма меньшую интенсивность люминесценции по сравнению с rTOP, стабильность сигнала была гораздо выше. Подробное изучение свойств rTOP-F140Y показало увеличение стабильности Соединения I по сравнению с ферментом дикого типа. Данный эффект, повидимому, обусловлен тем, что введенный вблизи активного центра остаток Туг снижает вероятность инактивации фермента в результате образования радикалов

- 26 -

на каталитически важных остатках. Оптимальные условия проведения реакции окисления люминола оказались сходны для nTOP, rTOP и rTOP-F140Y, за исключением значения pH: если в случае nTOP оптимальное значение pH составляло 9,2-9,5, то для rTOP и rTOP-F140Y оно упало до 8,2-8,3, что говорит о меньшей стабильности рекомбинантного фермента по сравнению с нативным. Данное предположение подтверждается и более быстрым падением интенсивности люминесценции (если в случае nTOP сигнал уменьшался на 50 % за 25-30 минут, то в случае rTOP – за 10 минут). Таким образом, рекомбинантный фермент сохранил высокую активность по отношению к люминолу, однако его операционная стабильность несколько уступает nTOP, что, наиболее вероятно, связано с отсутствием гликозилирования.

2.2. Влияние ионов кальция на свойства пероксидаз

Наличие двух кальций-связывающих доменов характерно для пероксидаз ІІ (пероксидазы грибов) и III (пероксидазы растений) групп из суперсемейства растительных пероксидаз. Оба иона кальция (дистальный и проксимальный) имеют по 7 координационных связей с боковыми карбокси- и гидрокси-группами, а также карбонильными группами. В случае дистального Ca²⁺ в координации участвует и одна молекула кристаллической воды. На рис. 2.10 для сравнения приведены структуры кальций-связывающих сайтов ТОР и HRP C. Кальций-связывающие сайты непосредственно связаны с активным центром фермента, так как в координации ионов кальция участвуют остатки, соседние с дистальным (каталитическим) и проксимальным (координирующим гем) остатками His. Для TOP это остатки Asp43 (рядом с His42) и Thr168 (рядом с His167). Каждый из этих остатков образует по 2 связи с Ca²⁺, поэтому потеря ионов кальция может приводить к существенным изменениям в свойствах фермента. Кроме того, дистальный кальций-связывающий сайт связан с каталитическим His42 системой водородных связей (через молекулы кристаллической воды и остатки Glu63 и Asn69). Несмотря низкую на степень гомологии аминокислотных последовательностей ТОР и HRP C (около 50 %) структура кальций-связывающих

- 27 -

сайтов данных ферментов практически идентична, что подтверждает их важную роль.



Рис. 2.10. Структуры кальций-связывающих сайтов пероксидазы табака (слева) и пероксидазы хрена (справа).

Первые работы по изучению роли ионов кальция были посвящены HRP C. Данные исследований показали, что извлечение Ca^{2+} приводит к снижению активности HRP C на 50-60 % [51,52]. При этом последующее добавление избытка Ca^{2+} позволяет восстановить до 85-95 % от исходной каталитической активности [51,52], то есть потеря ионов кальция является обратимым процессом. Также было показано, что при извлечении Ca^{2+} снижается стабильность Соединения I [53]. Изучение ЯМР-спектров нативного фермента и фермента после извлечения Ca^{2+} выявило существенные различия в структуре гем-связывающей области [53]. Данные ЯМР-спектроскопии также показали, что для поддержания правильной конформации HRP C достаточно присутствия только одного эндогенного иона кальция: после добавления к безкальциевому ферменту Ca^{2+} в молярном соотношении 1:1 ЯМР-спектр становился идентичным спектру нативного фермента. Это наблюдение говорит о неэквивалентности дистального и проксимального кальций-связывающих доменов и их роли в поддержании конформации фермента [54]. Аналогичные данные были получены и в эксперименте с использованием радиоактивного изотопа ⁴⁵Ca²⁺ [52]. Также было показано, что извлечение Ca²⁺ с помощью хелатирующих агентов влечёт сильное падение термостабильности HRP C [51,55].

Сравнение спектров поглощения нативной и безкальциевой HRP С также выявило заметные различия. Спектр безкальциевого фермента сильно зависел от pH: при pH 6,8 он был схож со спектром поглощения нативного фермента, в то время как при pH 8,2 интенсивность пика Соре была значительно ниже, а сам пик – шире, кроме того происходил сдвиг других характерных полос поглощения – Q и СТ [56]. Это говорит о существенных конформационных изменениях в окружении гема при повышении pH в случае безкальциевой HRP C. На основании полученной зависимости сдвига полосы Соре (403 нм) и СТ-полосы (640 нм) от значения рН было определено значение рКа, равное 7,4 [56], и был сделан вывод, что структурные изменения в безкальциевой HRP С обусловлены протонированиемдепротонированием аминокислотного остатка с pKa = 7,4. Авторы предположили, что этим остатком является дистальный His42. При щелочном pH остаток His42 депротонируется, что приводит к разрушению водородной связи с Asn70, а молекула кристаллической воды в активном центре связывается с атомом железа гема, переводя его в 6-координационное состояние. При этом нарушается система водородных связей между Arg38, His42, кристаллической водой и гемом (см. рис. 2.11).



Рис. 2.11. Система водородных связей между активным центром и кальцийсвязывающими сайтами пероксидазы хрена [56].

Данные, полученные с использованием метода кругового дихроизма, также подтвердили наличие существенных изменений в области активного центра HRP C после потери Ca²⁺ [56]. При этом было показано, что вторичная структура нативной и безкальциевой HRP C различается слабо (изменение в содержании альфаспиралей составляет около 2-3 %) [57,58]. Дополнительная информация о конформационных изменениях была получена при изучении связывания флуорофора 1-анилинонафтален-8-сульфоновой кислоты, при связывании которого с гидрофобными участками полипептидной цепи происходит усиление интенсивности флуоресценции. Было показано, что при повышении pH безкальциевая HRP C переходит в форму «расплавленной глобулы» [56].

Методом рамановской спектроскопии было изучено влияние потери Ca^{2+} на конформацию гема в HRP C [52,59,60]. При pH = 10 рамановские спектры безкальциевой HRP C и нативного фермента были практически идентичны. Так как при pH = 10 происходит присоединение гидроксильной группы к атому железа гема (переход в 6-координационное состояние), потеря кальция при сильнощелочных значениях pH, по-видимому, не приводит к дальнейшим изменениям в конформации гема [52]. В ходе исследования связывания монооксида углерода были получены аналогичные данные: извлечение Ca²⁺ также не приводило к изменениям в рамановском спектре безкальциевой HRP C, при

- 30 -

этом, как и в нативном ферменте, образовывалась водородная связь между СО и дистальными остатками Arg38 или His42 [52]. Однако при pH 7,8 и 8 в безкальциевом ферменте наблюдалось образование бис-гистидиновой формы гема (эта форма являлась основной, хотя часть молекул фермента по-прежнему сохраняла гем в 5-координационном состоянии) [52,60]. Прямым следствием перехода гема в 6-координационное состояние являлось падение каталитической активности фермента.

Таким образом, эндогенные ионы кальция (в первую очередь дистальный) имеют большое значение для поддержания структуры активного центра HRP C, спинового состояния атома железа гема, что влияет на каталитические свойства фермента. Однако на свойства фермента оказывает влияние и концентрация экзогенных ионов кальция. В частности, внесение в раствор Ca²⁺ повышало стабильность HRP C к денатурации гуанидин хлоридом [61]. Одним из вероятных объяснений данного эффекта является компактизация структуры HRP C вследствие неспецифического связывания ионов кальция.

Сходные данные по влиянию Ca^{2+} на ферментативную активность и стабильность были получены для катионной пероксидазы арахиса [62], за исключением того, что для поддержания нативной структуры пероксидазы арахиса необходимо наличие обоих ионов кальция [63]. Также было показано, что в пероксидазе арахиса сайты связывания кальция имеют примерно одинаковую аффинность [63]. Кроме того, из-за низких констант связывания добавление ионов кальция в среду необходимо для сохранения активности фермента при длительном хранении [64]. Также было проведено изучение влияния концентрации экзогенных ионов кальция на каталитическую активность пероксидазы сои и пероксидазы пшеницы. Было обнаружено, что при в присутствии 200 мМ CaCl₂ активность пероксидаза сои по отношению к вератровому спирту возрастает примерно в 2,5 раза [65]. Пероксидаза пшеницы без добавления ионов кальция с среду практически неактивна, но после добавления Ca^{2+} её активность увеличивается

- 31 -

почти на два порядка [66], при этом наблюдается также смещение pH-оптимума фермента (с 4,2 до 4,8).

Много данных накоплено и по влиянию ионов кальция на свойства пероксидаз II класса суперсемейства «растительных» пероксидаз. Марганецпероксидаза, выделенная из Phanerochaete chrysosporium, содержит четыре иона Ca²⁺, однако диализ или добавление хелатирующих агентов приводит к быстрой потере двух ионов Ca²⁺ без снижения её каталитической активности [67]. При нагревании также вначале происходит быстрая потеря двух ионов Ca²⁺ без снижения каталитической активности с последующей медленной стадией диссоциации дистального иона кальция, в результате чего фермент становится неактивным [67]. Также к диссоциации ионов кальция приводит инкубация фермента при pH > 8,6, причём данный процесс является обратимым [68]. Было показано, что потеря дистального иона кальция влечёт сильные конформационные изменения в дистальном домене марганец-пероксидазы: каталитический остаток His46 становится лигандом атома железа, переводя его в 6-координационное состояние [69,70]. Добавление ионов кальция в среду повышает стабильность марганец-пероксидазы при термоинактивации, особенно при щелочных значениях рН [67,71]. Так, в присутствии 100-кратного молярного избытка Ca²⁺ время Ph. chrysosporium при 45 °C полужизни для марганец-пероксидазы ИЗ увеличивается примерно в 15 раз [72]. Аналогичный эффект был показан и для марганец-пероксидаза из *Phlebia radiata*: добавление CaCl₂ привело к увеличению полужизни фермента при 50 °C в 22 раза (с 24 до 533 мин) [73]. При этом в присутствии EDTA термоинактивация фермента протекает быстрее [73].

В лигнин-пероксидазе из *Phanerochaete chrysosporium* один ион кальция также связан слабее. Добавление избытка Ca²⁺, как и в случае марганецпероксидазы, повышает термостабильность лигнин-пероксидазы [74], а удаление эндогенных ионов кальция (с помощью EGTA, оксалата) ускоряет термоинактивацию фермента [74]. Как и в случае марганец-пероксидазы потеря ионов кальция происходит при щелочных значениях pH, что приводит к

- 32 -

образованию связи между атомом железа гема и дистальным каталитическим остатком His47 (рис. 2.12) [75,76]. Исследование с использованием радиоактивного изотопа кальция 45 Ca²⁺ показало, что обмен между эндогенными и экзогенными ионами кальция практически не происходит [75], в отличие от HRP C [51,52].



Рис. 2.12. Предполагаемые механизм инактивации лигнин-пероксидазы из *Phanerochaete chrysosporium* при щелочных значениях pH в результате потери ионов кальция [75].

В отличие от лигнин- и марганец-пероксидаз, формирование связи между каталитическим остатком His42 и атомом железом гема в HRP C затруднено, так как дисульфидная связь Cys44-Cys49 вблизи дистального сайта связывания кальция поддерживает структуру дистального домена даже при потере Ca²⁺ [52]. Данная гипотеза подтверждается тем, что введение дисульфидной связи вблизи дистального кальций-связывающего сайта значительно повысило стабильность марганец-пероксидазы [77].

Таким образом, на сегодняшний день накоплен большой объём данных о влиянии ионов кальция на каталитические свойства и стабильность как растительных, так и грибных пероксидаз.

В нашей лаборатории ранее также было показано влияние Ca²⁺ на некоторые свойства пероксидазы табака. Так, в присутствии избытка хлорида кальция

активность nTOP в реакции окисления вератрового спирта при экстремально низких значениях pH (около 1,8) возрастает в три раза [78]. В то же время, внесение ионов кальция в анализируемую смесь приводило к снижению отклика безмедиаторного биосенсора на основе rTOP на пероксид водорода [79].

2.3. Экспрессия и рефолдинг рекомбинантной пероксидазы табака

Выделение ТОР из природного источника (Nicotiana tabacum) возможно только в небольших количествах (из 1 кг листьев после очистки удаётся получить около 5 мг nTOP, при этом лишь 25 % составляет холо-фермент), что делает практически невозможным применение нативного фермента в биоаналитических целях. После того, как в лаборатории проф. Марка Лагримини (Mark Lagrimini) с использованием синтетического гена были получены трансгенные растения табака (Nicotiana sylvestris) и томатов, сверхпродуцирующих пероксидазу из N. tabacum, на порядок вырос выход гликозилированного фермента в пересчёте на 1 кг биомассы (табачных листьев или плодов томата) – до 60 мг TOP с RZ > 3 [80,81]. Однако трансгенные растения табака быстро увядали, а плоды трансгенных томатов были значительно меньшего размера по сравнению с нормальными растениями. Это затрудняло наработку достаточного количества биомассы. Кроме того, скорость синтеза гема в трансгенных растениях была недостаточной по сравнению со скоростью продукции апо-ТОР, поэтому в процессе выделения фермента необходимо было дополнительно вносить гемин в растительный экстракт. Также большую проблему представляла очистка выделенной ТОР от образующихся в результате пероксидазного катализа полимерных фенольных соединений, накапливающихся в больших количествах в листьях табака (и в меньшей степени в плодах томатов). Всё это в совокупности сильно затрудняло масштабирование процесса выделения ТОР из трансгенных растений.

Поэтому необходимо было разработать другую систему экспрессии пероксидазы табака. После клонирования гена *top*, осуществлённого также М. Лагримини с соавт. [7], в нашей лаборатории была создана система экспрессии рекомбинантной пероксидазы табака (rTOP) в клетках *Escherichia coli* [82].

- 34 -

Уровень экспрессии rTOP в полученном штамме *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)pLysS составлял около 40 % от общего белка клетки. Однако rTOP экспрессируется в клетках *E. coli* в виде нерастворимых телец включения, поэтому для получения активного фермента необходимо проведение процедуры *in vitro* ренатурации (рефолдинга).

На сегодняшний день существует множество подходов к проведению рефолдинга рекомбинантных белков, основные из которых будут рассмотрены более подробно в следующих разделах.

2.3.1. Методы *in vitro* ренатурации рекомбинантных белков, экспрессирующихся в виде телец включения

Экспрессия рекомбинантных белков в клетках *E. coli* широко применяется на практике. Около 40 % белков для биофармацевтических целей получают с использованием данной системы экспрессии [83]. Это обусловлено в первую очередь простотой её использования, легкостью масштабирования, низкой себестоимостью и быстрым ростом биомассы [84,85]. Однако из-за отсутствия в клетках E. coli систем посттрансляционных модификаций белков в них зачастую свернутых происходит агрегация неправильно молекул целевого белка (образование т.н. телец включения). В этом случае для получения биологически активного белка необходимо проводить процедуру in vitro ренатурации (рефолдинга). Так как оптимальные условия рефолдинга для всех белков значительно различаются, эта стадия является главным «узким местом» при получении рекомбинантных белков. С другой стороны, белки в тельцах включения в основном не подвержены протеолитической деградации, а также могут быть легко выделены из клеточного лизата за счёт чередования промывок и центрифугирования, при этом доля целевого белка в отмытых тельцах включения может достигать 90 %, что значительно упрощает его последующую очистку [86,87].

В последние два десятилетия было предложено множество различных подходов к *in vitro* ренатурации рекомбинантных белков [88–97]. Также стали

- 35 -

доступны коммерческие наборы для проведения рефолдинга белков (например, «Refold Master» фирмы «Novexin» (Великобритания), «Protein Refolding Kit» фирмы «Thermo Scientific» (США) и «QuickFold» фирмы «AthenaES» (США)). Тем не менее, подобные наборы могут является только отправной точкой для проведения рефолдинга, а поиск оптимальных условий ренатурации по-прежнему остаётся уникальной задачей для каждого конкретного белка.

Стандартная процедура рефолдинга рекомбинантных белков, экспрессирующихся в виде телец включения, включает четыре основных этапа: 1) выделение и отмывку телец включения; 2) солюбилизацию белковых агрегатов с помощью высоких концентраций хаотропных агентов (например, мочевины или гуанидин хлорида) в присутствии DTT или 2-меркаптоэтанола (для восстановления внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей); 3) непосредственно рефолдинг (при снижении концентрации денатурирующего агента); 4) очистку ренатурированного белка.

«Классические» методы рефолдинга включают различные варианты метода разведения солюбилизированного белка в большом объёме рефолдинг-среды, диализ и различные хроматографические подходы. В последние годы также достаточно часто применяется рефолдинг при высоком гидростатическом давлении. Используются и менее распространённые методы рефолдинга, например, с использованием обращённых мицелл [98], несмешивающихся жидкостей [99], цеолита [100,101], пэгилирования [102], наночастиц (например, углеродных нанотрубок [103] или золотых наночастиц [104]) и микрофлюидных чипов [89,105].

Более подробно основные подходы к проведению рефолдинга рекомбинантных белков рассмотрены далее.

2.3.2. Рефолдинг белков методом разведения

Ренатурация белков путём разведения в большом объёме рефолдинг-среды является одним из самых простых методов: солюбилизированный белок при перемешивании вносится непосредственно в рефолдинг-среду. Этот метод часто

- 36 -
используется в биофармацевтическом производстве из-за легкости масштабирования, валидации и дешевизны.

Простейший вариант данного метода предполагает единовременное внесение солюбилизированного белка при перемешивании в большой объём рефолдинг-среды. При этом концентрация денатуранта резко падает и происходит быстрое сворачивание полипептидной цепи. Если же для получения активного белка требуется обеспечить постепенное сворачивание полипептидной цепи, случае используют метод обратного разведения. В этом к раствору денатурированного белка медленно добавляют рефолдинг-среду. К минусам данного подхода относится увеличение вероятности формирования агрегатов. Ещё одним вариантом рефолдинга методом разведения является смешение потоков денатурированного белка и рефолдинг-среды при неизменной скорости. В отличие от двух первых вариантов, в этом случае концентрация белка и денатуранта в смеси всегда остаются постоянными. Также разведение может осуществляться импульсным (pulsed) способом: аликвоту солюбилизированного белка вносят в рефолдинг-среду, затем инкубируют определённое время, после чего вносят новую аликвоту и т.д. Как правило, новую порцию денатурированного белка вносят, когда достигается около 80% от максимальной активности [106]. Такой подход позволяет снизить единомоментную концентрацию частично свёрнутого белка. При этом количество белка, которое добавляют за один раз, подбирают эмпирически. Впервые данный метод был применён для рефолдинга куриного лизоцима в 1992 году [107]. При этом удалось повысить выход рефолдинга в 5 раз (до 80 %) по сравнению с применявшимся ранее стандартным методом разведения. В случае же костного морфогенетического белка-2 эффективность рефолдинга при использовании единовременного и импульсного разведения была практически одинакова, но использование последнего проводить рефолдинг при более высокой концентрации белка в рефолдинг-среде [108]. Применение рефолдинга с помощью импульсного разведения даёт хорошие результаты, когда ренатурированный белок не склонен образовывать агрегаты с денатурированным или частично свёрнутым.

- 37 -

Так как в рефолдинг-среде протекают конкурирующие процессы агрегации (кинетика второго и более порядка) и рефолдинга (кинетика первого порядка) [109], применяются различные подходы для снижения вероятности образования агрегатов. Например, снижение концентрации белка до 0,1 мг/мл и ниже – эффективный способ повышения выхода активного белка. Также минимизировать агрегацию позволяют различные низкомолекулярные добавки. Так, мочевину и гуанидин хлорид в небольших концентрациях добавляют в рефолдинг-среду для снижения межмолекулярных взаимодействий. Применяются также различные сурфактанты (Tween 20, Triton X-100, CHAPS), осмолиты (глицерин, сорбитол, сахароза) и водорастворимые полимеры (PEG). В рефолдинг-среду часто добавляют в небольших концентрациях EDTA или EGTA для предотвращения окисления сульфгидрильных групп, катализируемого ионами металлов, И образования межмолекулярных сшивок. Но так как для правильного фолдинга порядка 30 % всех белков требуются различные кофакторы [110], добавление EDTA не всегда возможно.

Другим важным фактором является правильное образование дисульфидных связей. Это достигается посредством внесения смеси окисленных и восстановленных тиоловых реагентов, таких как окисленный и восстановленный глутатион, дитиотреитол, цистеин, цистин, цистеамин и цистамин. Наиболее часто используются концентрации тиоловых реагентов в диапазоне 5-15 мМ.

Метод рефолдинга путём разведения применялся для получения различных рекомбинантных пероксидаз. Проведение *in vitro* ренатурации гем-содержащих пероксидаз сопряжено с рядом трудностей, так как для правильного протекания фолдинга необходимо присутствие ионов кальция и гема в среде, а также необходимо обеспечить формирование правильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков и снизить их образование между молекулами фермента. Из-за множества критических параметров рефолдинг пероксидаз является комплексным процессом, в связи с чем затруднена его оптимизация. Это объясняет

- 38 -

сравнительно низкие выходы активного фермента при ренатурации пероксидаз (см.

табл. 2.1)

Таблица 2.1

Данные	по	эффективности	рефолдинга	различных	рекомбинантных	белков	c
использованием метода разведения.							

Белок	Ссылка	Выход активного белка.	Эффективность рефолдинга,%
	000000	мг/л культ. среды	
Пероксидаза хрена, изофермент С	[111]	16,7	25
Пероксидаза репы	[112]	29	
Пероксидаза из Arabidopsis thaliana	[113]	13	23
Пероксидаза ячменя	[113]	9,4	38
Лигнин-пероксидаза Н8	[114]		1
Марганец-пероксидаза из Phanerochaete chrysosporium	[115]	0.6	
Многофункциональная (versatile) пероксидаза из <i>Pleurotus eryngii</i>	[116]		7
S-пероксидаза	[117]	2,9	
Лакказа из Bacillus sp. HR03	[118]	_	70
Gloshedobin	[119]	—	22,5 (46,4*)
Липаза из <i>Psychrobacter</i> cryohalolentis K ^{5T}	[120]		40*
Белок теплового шока Hsp42	[121]		15
Тканевый активатор плазминогена	[122]	—	40
Секретируемые кальций- связывающие белки SMOC-1 и SMOC-2	[123]	25	62,5
L-аспарагиназа	[124]	97	88.2
TIpC хеморецептор из Helicobacter pylori	[125]	8	26,7
Человеческий фактор некроза опухоли-α	[126]		32,2
Человеческий белок ADAMTS-18	[127]	35,1	67,8
Альфа-фетопротеин	[128]		75
Человеческий костный морфогенный белок-2	[108]	_	43
Куриный лизоцим	[129]		95
Куриный лизоцим	[130]		60
Карбоангидраза	[130]		80

*Рефолдинг проводился в присутствии шаперонов

Разработанный ранее в нашей лаборатории протокол рефолдинга rTOP также основан на использовании быстрого разведения солюбилизированного апофермента в рефолдинг-среде. Однако эффективность рефолдинга, достигнутая при использовании данной методики, не превышала 14 % [8,131]. Столь низкая эффективность рефолдинга сильно ограничивает возможность применения rTOP в качестве компонента биоаналитических систем, что делает актуальным поиск путей повышения выхода ренатурированного фермента.

2.3.3. Рефолдинг белков с использованием диализа

Другим способ снижения концентрации денатурирующего агента является диализ. Диализ, как правило, применяют в том случае, если концентрация денатурированного белка и так низка или когда требуется полная смена буфера. Существенным недостатком данного метода является медленная скорость смены буфера, что значительно увеличивает вероятность агрегации частично свёрнутого белка [128]. В этом случае многократная смена буфера позволяет повысить выход ренатурации [132]. В сравнении с методом разведения при проведении рефолдинга с использованием диализа образуется больше белковых агрегатов, что негативно отражается на выходе активного белка. Кроме того, возможна и неспецифическая адсорбция целевого белка на мембране, что также снижает эффективность ренатурации. Тем не менее, в некоторых случаях удаётся достигнуть достаточно высоких выходов рефолдинга при использовании диализа [133–135].

2.3.4. Хроматографические методы рефолдинга белков

Существуют три различных подхода к использованию хроматографических методов для проведения рефолдинга: 1) гель-фильтрационные колонки используют для снижения концентрации денатурирующего агента; 2) применение ионообменной и аффинной хроматографии позволяет предварительно очистить денатурированный целевой белок от примесей; 3) использование носителей с иммобилизованными шаперонами ускоряет протекание ренатурации и повышает её эффективность [136].

Рефолдинг в случае применения гель-фильтрационной хроматографии происходит за счёт постепенного снижения концентрации хаотропного агента. При этом агрегаты и ренатурированный белок разделяются по молекулярной массе.

- 40 -

Этот метод был разработан в 1994 году М. Werner с соавт. [137]. Эффективность метода была продемонстрирована на трёх различных белках: рекомбинантном транскрипционном факторе ETS-1 человека, бычьей рибонуклеазе А и белке IHF из E. coli [137]. Эффективность ренатурации данных белков составляла более 60 % (подробнее см. табл. 2.2). Несмотря на высокие выходы, авторы отметили и наличие важного лимитирующего фактора – растворимости переходных форм при фолдинге (при снижении концентрации денатуранта может происходить агрегация частично свёрнутого белка и образование межмолекулярных дисульфидных связей). Также хотя при гель-фильтрации происходит очистка ренатурированного белка от агрегатов, последние могут «забивать» колонку, если образуются в большом количестве [137]. В то же время для некоторых белков возможно проведение рефолдинга при очень высокой концентрации белка (например, до 80 мг/мл для куриного лизоцима и бычьей карбоангидразы [130]). Кроме того, использование градиента денатуранта позволяет увеличить эффективность рефолдинга (использование градиента мочевины при проведении рефолдинга куриного лизоцима привело к трёхкратному увеличению выхода целевого белка) [138,139]. Однако для большинства белков эффективность рефолдинга на гельфильтрационной колонке не превышает эффективность рефолдинга при использовании метода разведения. Но всё же немаловажным преимуществом использования гель-фильтрации является более высокая чистота получаемого препарата, достигаемая счёт отделения белковых агрегатов за И низкомолекулярных примесей. Данный подход был успешно применен для получения различных рекомбинантных белков [130,139–146] (данные по эффективности рефолдинга некоторых белков приведены в табл. 2.2).

В случае использования ионообменной или аффинной хроматографии сорбция целевого белка на колонке в денатурирующих условиях позволяет избавиться от многих примесей и при этом избежать образования агрегатов за счёт снижения межмолекулярных взаимодействий [147]. Применение ионообменной хроматографии требует тщательного подбора условий, так как в противном случае

- 41 -

могут происходить неспецифические взаимодействия с матрицей, мешающие протеканию рефолдинга целевого белка [148,149]. Также выход рефолдинга сильно зависит от таких факторов, как природа носителя, температура. Тем не менее при правильном выборе условий эффективность ренатурации может быть очень высокой, причём рефолдинг может быть осуществлён при высоких концентрациях белка (порядка 5 мг/мл). Ещё одним достоинством данного подхода является снижение конечного разведения ренатурированного белка за счёт сорбции на колонке. Одна из модификаций данного метода состоит в применении в качестве носителей шариков. Это позволяет осуществлять процесс рефолдинга в случае больших объёмов растворов за короткое время.

Таблица 2.2

Белок	Ссылка	Выход активного белка, мг/л культ. среды	Эффективность рефолдинга,%
Транскрипционый фактор ETS-1 человека	[137]		71
Бычья рибонуклеаза А	[137]		>90
Белок IHF из E. coli	[137]		60
Куриный лизоцим	[130]		100
Карбоангидраза	[130]		85
Субъединицы тромбоцитарного фактора роста PDGF-AB	[144]	—	>90
Человеческий костный морфогенетический белок 7	[150]	_	71,8
Человеческий фактор стволовых клеток	[151]		49,6
Человеческий Е-селектин	[152]	17,5	19
Gloshedobin	[119]		21,6 (43,8*)
Человеческий фактор некроза опухоли-α	[126]		76,8
Человеческий белок pLG72	[153]	42	63,6
Hahellin	[154]	16	
Белок NTA	[155]		37

Данные по эффективности рефолдинга различных рекомбинантных белков с использованием хроматографических методов.

*Рефолдинг проводился в присутствии шаперонов

В случае аффинной хроматографии с матрицей взаимодействует только определённый домен белка, в то время как остальная глобула остаётся подвижной, что облегчает протекание рефолдинга. Поэтому использование аффинной хроматографии является более предпочтительным по сравнению с ионообменной. Одним из часто применяющихся на практике вариантов аффинной хроматографии является металл-аффинная хроматография, которая используется для His6меченных белков [156–160]. Для иммобилизации на носителе (катионообменном) может быть использована и полиаргининовая метка на N- или C-конце полипептидной цепи. Данный подход был успешно использован для рефолдинга αглюкозоксидазы [161]. Ещё один способ предполагает создание фьюжина целевого белка с целлюлозосвязывающим доменом [162] и основанный на использовании способности целлюлозосвязывающего домена связываться с целлюлозной матрицей даже в 6 M мочевине. С помощью данного подхода удалось достичь в 3 раза большей эффективности рефолдинга одноцепочечных антител в сравнении с методом разведения [162].

Третья группа хроматографических методов для рефолдинга белков иммобилизацию предполагает предварительную носителе белков, на фолдингу способствующих правильному целевого белка (искусственные шапероны) [163,164]. Этот подход был использован для рефолдинга маркеров Тлимфоцитов CD1 [165]. Другой пример _ применение матрицы с иммобилизованными минишапероном GroEL, бактериальной дисульфидоксидоредуктазой DsbA и пептидилпролилизомеразой для рефолдинга токсина скорпиона Cn5 [166], обеспечившее эффективности рефолдинга порядка 87 %. Но так как данный подход является достаточно сложным и дорогостоящим, он может быть использован для получения небольших количеств рекомбинантных белков, которые не удаётся ренатурировать другими методами.

2.3.5. Рефолдинг при высоком гидростатическом давлении

В последнее десятилетие для получения рекомбинантных белков, экспрессирующихся в виде телец включения, достаточно часто рефолдинг проводят при высоком гидростатическом давлении [167–177]. Этот метод может быть использован также для дезагрегации и рефолдинга различных белковых преципитатов и амилоидных фибрилл.

- 43 -

То, что высокое гидростатическое давление приводит к денатурации многих белков, известно с начала XX века [178]. Обычно диссоциация мультимерных комплексов происходит при давлении 1000-3000 бар [179]. При 4000 бар начинает разрушаться вторичная структура белка [180]. Для полной денатурации белков требуется повышение давления до 8000 бар. При этом происходит уменьшение объёма молекулы за счёт разрушения электростатических и гидрофобных взаимодействий в полостях белковой глобулы [181,182].

Преимуществом применения для рефолдинга рекомбинантных белков высокого гидростатического давления является то, что для солюбилизации телец включения не требуются большие концентрации хаотропных агентов [183]. Также при денатурации под давлением сохраняется больше элементов вторичной структуры белка, чем при денатурации с использованием хаотропных агентов [184]. Ещё одним преимуществом данного метода является то, что рефолдинг может быть осуществлён при высокой концентрации белка, что позволяет избежать последующей стадии концентрирования. Тем не менее для успешного проведения рефолдинга требуется тщательный подбор состава рефолдинг-среды (в первую очередь, концентрации хаотропных агентов и окислительно-восстановительных соединений), так как приложение высокого гидростатического давления не позволяет разорвать дисульфидные и водородные связи [185]. Также сильное рефолдинга влияние на эффективность оказывает температура: для рекомбинантного человеческого гормона роста повышение температуры с 20 до 60 °С позволило повысить долю растворимого белка после 24-часовой инкубации при 2000 бар с 10 до 90 % [186]

Первая работа по рефолдингу рекомбинантных белков из телец включения с использованием высокого гидрастатического давления была проведена в 1999 году [187]. Авторы исходили из предположения, что возможно подобрать такое давление, при котором солюбилизация белковых агрегатов уже происходит, но протекает и рефолдинг. После 48-часовой инкубации телец включения, содержащих β-лактамазу (0,1 мг/мл) при 37 °C, 2000 бар и без добавления

- 44 -

хаотропных агентов выход ренатурации составил 85 % [187]. В последующие годы данный метод был эффективно применён для рефолдинга ещё нескольких белков (см. табл. 2.3)

Таблица 2.3

Белок	Ссылка	Выход активного белка, мг/л культ. среды	Эффективность рефолдинга,%
Bikunin	[188]		79
Эндостатин	[189]	90	35,6
Мышиный гормон роста	[176]	_	90
Bothropstoxin-1	[175]	7,6	32
Человеческий интерферон-β-1b	[190]	_	65
Белок OmpA70 из Leptospira interrogans	[177]		40

Данные по эффективности рефолдинга различных рекомбинантных белков с использованием высокого гидростатического давления.

2.4. Использование пероксидазы табака в качестве ферментной метки для иммуноанализа

Различные варианты иммуноанализа являются основными диагностическими системами, использующимися во всех областях медицины, а также широко применяющимися в ветеринарии, пищевой промышленности, биотехнологии и научных исследованиях.

В настоящее время всё большее применение на практике находит метод хемилюминесцентного иммуноанализа (CLIA). В отличие от стандартного иммуноферментного анализа, он не требует длительной инкубации, позволяет определять аналиты в пикомолярной концентрации (а не в наномолярной) при значительно более широком линейном диапазоне (3-4 порядка концентраций, а не 2), поэтому часто не требует предварительного разведения концентрированных образцов [191]. Также при проведении CLIA ниже расход субстратов и не требуется вносить стоп-реагенты.

В основе CLIA лежит детекция люминесценции, возникающей в результате протекания хемилюминесцентной реакции. Хемилюминесцентные реакции в основном являются окислительно-восстановительным, при этом продукт

химической реакции образуется в возбуждённом состоянии и при переходе в основное состояние излучает фотоны в ультрафиолетовом, видимом или ближнем инфракрасном диапазоне. Сегодня существует множество различных хемилюминесцентных субстратов, но наиболее часто на практике используются люминол и изолюминол. При этом изолюминол и его производные используются в качестве метки, а люминол – в свободном виде, так как квантовый выход при его окислении значительно падает при сшивке [192]. При использовании в качестве субстрата люминола катализатором его окисления выступает ферментная метка, образуется электронно-возбуждённый продукт (3-аминофталат) при ЭТОМ (рис. 2.13), который при переходе в основное состоянии испускает кванты света с максимумом излучения в районе 425 нм [193].



Рис. 2.13. Упрощённая схема реакции окисления люминола пероксидом водорода, катализируемой пероксидазой из корней хрена (HRP).

Для повышения чувствительности анализа в реакционную смесь также часто добавляют т.н. «усилители хемилюминесценции». Для приведённой выше реакции окисления люминола, HRP C, в качестве усилителей используют производные 6гидроксибензотиазола и *пара*-замещенные фенолы (на практике наиболее часто используется *n*-йодфенол) [194].

2.4.1. Ферментные метки в иммуноанализе

Ферменты часто выступают в качестве метки для различных биоконъюгатов. Большое разнообразие доступных субстратов позволяет проводить детекцию ферментных меток различными способами (в том числе, колориметрически, по флуоресценции или люминесценции). Наиболее часто в качестве ферментной метки для иммуноферментного анализа используют HRP C, щелочную фосфатазу, β-галактозидазу и глюкозоксидазу. При этом HRP C входит в состав примерно 80 % конъюгатов антитело-фермент, большинство из которых используется как компонент различных диагностических систем. Щелочная фосфатаза занимает второе место по применению на практике. А глюкозоксидазу и β-галактозидазу используют в основном для научных исследований (доля коммерческих наборов с их использованием в качестве метки составляет менее 1%).

Для HRP C коммерчески доступно множество различных электрондонорных субстратов, при окислении которых образуются растворимые окрашенные продукты (фотометрическая детекция), нерастворимые окрашенные продукты (используются в мембранном анализе, при исследовании срезов тканей), а также флуоресцентные или хемилюминесцентные продукты. Относительно небольшая масса HRP C (около 44 кДа) является важным преимуществом данного фермента по сравнению, например, с щелочной фосфатазой, так как применение различных протоколов позволяет получать конъюгаты нужным с соотношением антитело:фермент. В частности, возможно получение конъюгатов небольшого размера, которые способны проникать в ткани и клеточные структуры, что для проведения иммуноцитохимического окрашивания [195]. используется Большое значение имеет и достаточно высокая стабильность HRP C К термоинактивации (при температурах ниже 60 °C) [196,197] и к изменению pH (4-10) [198]. Важно и то, что конъюгация HRPC с антителами, как правило, не приводит к заметному снижению каталитической активности. К недостаткам данного фермента относится ограниченная возможность модификации аминогрупп с использованием гетеробифункциональных агентов, так как для конъюгации доступны только две-три ε-аминогруппы (из шести остатков лизина - Lys84, 65, 149, 174, 232 и 241 - только Lys232 полностью доступен для модификации, а Lys174 и 241 – частично [199–201]). Ещё одним недостатком данного фермента, несмотря на его высокую каталитическую активность, является достаточно быстрое падение скорости реакции (низкая операционная стабильность).

Щелочные фосфатазы (К.Ф. 3.1.3.1) присутствуют во многих организмах, как прокариотических, так и эукариотических, за исключением некоторых высших растений [202]. Это группа мембран-связанных гликопротеинов, катализирующих гидролиз сложных эфирных связей в моноэфирах фосфорной кислоты с образованием свободного монофосфата. В состав большинства конъюгатов с антителами входит щелочная фосфатаза из кишечника теленка. Она представляет собой гомодимер и имеет вес около 140 кДа. Оптимальное значение рН составляет 9,5-10,5. В активном центре фермента находятся два иона цинка и один ион магния, необходимые для протекания катализа [203]. Химическая модификация щелочной фосфатазы при конъюгации с антителами зачастую приводит к снижению ферментативной активности. По сравнению с HRP С для щелочной фосфатазы коммерчески доступно значительно меньше субстратов. Кроме того, щелочная фосфатаза имеет более низкую каталитическую активность. Однако благодаря тому, что зависимость скорости реакции от времени является линейной, чувствительность анализа может быть повышена за счёт увеличения продолжительности инкубации [204]. Конъюгаты с щелочной фосфатазой используются как в иммуноферментном анализе, так и в иммуногистохимии, иммуноцитохимии и иммуноблоттинге. Окраска такими конъюгатами позволяет исследовать ткани, в которых из-за высокого содержания эндогенных пероксидаз невозможно использовать конъюгаты с HRP С из-за высокой фоновой окраски. Использование конъюгатов с щелочной фосфатазой обычно обеспечивает большую чувствительность анализа. С другой стороны, для HRP C существует гораздо больше хромогенных субстратов, дающих более яркую окраску.

ТОР имеет массу, близкую к массе HRP C (около 36 кДа для нативного фермента и около 32 кДа – для рекомбинантного), но проявляет гораздо большую активность в реакции окисления люминола [48,50] (см. раздел 2.1.4). При этом высокая интенсивность люминесценции достигается даже без внесения усилителей в реакционную смесь (интенсивность люминесценции выше на два порядка по сравнению с реакцией усиленной хемилюминесценции, катализируемой HRP C)

- 48 -

Важными преимуществами ТОР являются способность сохранять активность в присутствии высоких концентраций H_2O_2 . и более высокое соотношение сигналшум по сравнению с HRP C. Таким образом, ТОР является перспективной альтернативой для HRP C в качестве ферментной метки для иммуноанализа (в первую очередь, хемилюминесцентного).

2.4.2. Методы конъюгации ферментов с антителами

Получение меченных ферментом антител заданной специфичности лежит в основе создания иммуноферментных тест-систем, использующихся сегодня для определения сотен различных аналитов и позволяющих быстро диагностировать множество заболеваний.

Антитела представляют собой гликопротеины достаточно большой массы (около 150 кДа). Особенности структуры антител позволяют использовать различные способы модификации и конъюгации. Схематичное строение иммуноглобулина класса G (IgG) приведено на рис. 2.14. Молекула IgG состоит из двух пар идентичных полипептидных цепей: двух легких (L) и двух тяжёлых (H). Каждая тяжёлая цепь в свою очередь подразделяется на 4 домена (V_H, C_H1, C_H2 и C_H3) и шарнирную область. Лёгкие цепи включают по два домена (V_L и C_L). Тяжёлые цепи удерживаются вместе за счёт нековалентных связей, кроме того все цепи соединены между собой дисульфидными мостиками. Также дисульфидные мостики присутствуют внутри каждого отдельного домена. Домены V_H и V_L формируют два антиген-связывающих сайта антитела.

На поверхности молекулы IgG присутствует много функциональных групп, по которым может проводиться модификация антитела: аминогруппы остатков Lys, концевые аминогруппы, карбоксильные группы остатков Asp и Glu и концевые карбоксильные группы. Но так как остатки Lys, Asp и Glu распределены равномерно по поверхности антител, модификация также с равной вероятностью может происходить в любой части молекулы, что в свою очередь приводит к случайной ориентации антитела в конъюгате. При этом часто происходит блокировка антиген-связывающего сайта, что является причиной падения

- 49 -

аффинности антител в результате конъюгирования [205]. Более специфическая модификация может производиться по олигосахаридным цепям, а также по SHгруппам, образующимся после восстановления дисульфидных связей между тяжёлыми цепями антитела (в шарнирной области), например, с помощью DTT или 2-меркаптоэтиламина. В последнем случае в результате восстановления дисульфидных связей образуются два Fab' фрагмента, каждый из которых имеет один антиген-связывающий сайт [206,207]. Преимуществом данных подходов является пространственная удалённость ферментативной метки от антиген-распознающей области, препятствующая её блокировке.



Рис. 2.14. Схематическая строение молекулы иммуноглобулина класса G.

На выбор способа модификации влияют в первую очередь особенности строения антител и ферментов, конъюгаты которых требуется получить. Так, рекомбинантные антитела не имеют олигосахаридных цепей. Моноклональные антитела также зачастую не гликозилированы, поэтому для их модификации не может быть использовано окисление остатков сахара. Некоторые ферменты, напротив, сильно гликозилированы (например, HRP C имеет 6-8 олигосахаридных цепей, составляющих 20-25 % от массы фермента), которые могут легко быть подвергнуты периодатному окислению. Также для получения конъюгатов могут быть использованы SH-группы не антитела, а фермента (β-галактозидаза имеет множество SH-групп на поверхности, которые могут быть использованы для модификации).

Так как rTOP не гликозилирована, для её конъюгации с антителами могут быть использованы аминогруппы остатков Lys. Для модификации ферментов по используются гомобифункциональные аминогруппам агенты (например, глутаровый альдегид) и различные гетеробифункциональные агенты (такие, как SMCC и sulfo-SMCC). Глутаровый альдегид часто применяется на практике из-за простоты его использования. Однако его использование имеет ряд существенных недостатков. Во-первых, в растворе (особенно при хранении) может протекать его полимеризация по механизму альдольной конденсации. Такие полимеры, имеющие двойные связи, могут реагировать с аминогруппами, что приводит к образованию различных побочных продуктов при конъюгировании. Во-вторых, высокая реакционная способность глутарового альдегида не позволяет контролировать процесс конъюгации, поэтому сшивки часто формируются между несколькими молекулами фермента и в итоге образуются преципитаты высокомолекулярных белковых комплексов. Напротив, использование гетерибифункциональных агентов позволяет избежать формирования побочных белковых конъюгатов, поэтому их выбор предпочтителен при синтезе меченных ферментом антител.

2.4.3. Использование SMCC и sulfo-SMCC для модификации белков

конъюгации белков с использованием Для модификации амино-И сульфгидрильных групп применяют сшивающие агенты, имеющие две N-гидроксисукцинимид функциональные группы: (NHS) и К малеимид. преимуществам их использования относятся возможность контролировать процесс конъюгации, регулировать соотношение белков в конъюгате и суммарный молекулярный вес получаемого конъюгата. К таким гетеробифункциональным сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1агентам относится карбоксилат (SMCC). Так как SMCC плохо растворим в воде, на практике чаще

- 51 -

используют его водорастворимую форму – sulfo-SMCC (см. рис. 2.15) [208,209]. Эти сшивающие агенты широко применяются для получения конъюгатов гаптенноситель или антитело-фермент. Возможны и другие применения SMCC и sulfo-SMCC, например для конъюгации антител с лекарствами для их направленной доставки [210], а также углеродными нанотрубками [211].



Рис. 2.15. Структура сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилата (SMCC) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилата (sulfo-SMCC).

Для получения меченных ферментами антител на первом этапе обычно проводят модификацию аминогрупп фермента через NHS-эфирную группу SMCC с образованием амидной связи (см. рис. 2.16). Введённая таким образом на поверхность фермента малеимидная группа достаточно стабильна в водных растворах, однако она может гидролизоваться с образованием малеамовой кислоты, не способной реагировать с SH-группами. Гидролиз может протекать и после конъюгирования, при этом его скорость повышается с увеличением pH. Тем не менее, малеимидная группа SMCC (и sulfo-SMCC) стабильна при pH < 7,5 (в отличие от других сшивающих агентов, например, N,N'-o-фенилендималеимида и N,N'-оксидиметилендималеимида). При нейтральном pH и 30 °C за 2 часа гидролизу подвергается лишь около 4 % малеимидных групп SMCC [212,213]. При этом sulfo-SMCC более устойчив к гидролизу (при pH 7,0 и 30°C гидролиз не протекает в течение минимум 6 часов). Это позволяет провести очистку фермента от избытка сшивающего агента. Функционализированные малеимидом ферменты могут храниться продолжительное время в лиофилизированной форме при -20°C.

При pH 6,5-7,5 малеимидная группа образует связь с сульфгидрильными группами [214] (см. рис. 2.16). При pH 7,0 скорость реакции малеимидной группы с SH-группами на 3 порядка выше, чем с NH_2 -группами, но при более щелочных значениях pH разница в скоростях уменьшается, поэтому конъюгацию проводят при pH < 7,5.



Рис. 2.16. Схема конъюгации белков с использованием sulfo-SMCC.

Наличие нескольких стадий позволяет контролировать процесс (например, за счёт изменения соотношения реактивов влиять на количество модифицированных групп) и снизить вероятность полимеризации белков, участвующих в конъюгации. Как правило, при получении меченных ферментами антител модификации с использованием SMCC или sulfo-SMCC подвергают фермент. Антитела же либо активируют с помощью тиолирующих реагентов (например, SATA), либо получают SH-группы за счёт восстановления дисульфидных связей между тяжёлыми цепями.

2.4.4. Использование SATA для модификации белков

N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA) – гетеробифункциональный сшивающий агент, позволяющий вводить сульфгидрильные группы за счёт модификации первичных аминогрупп (рис. 2.17). С аминогруппами реагирует N-сукцинимидильная группа SATA, в результате образуется стабильная амидная связь. Введённая SH-группа стабильна до снятия ацетильной защитной группы, поэтому полученные активированные белки могут храниться в виде стоковых

растворов длительное время. При этом модификация антител с использованием SATA не приводит к снижению аффинности [215]. Поэтому SATA – один и наиболее часто использующихся реагентов для получения конъюгатов антител с ферментами.



Рис. 2.17. Структура N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA).

Деацетилирование осуществляется добавление гидроксиламина (рис. 2.18). Так как для деацетилирования не требуется внесения тиольных восстанавливающих агентов (например, DTT), модификация не приводит к нарушению внутримолекулярных дисульфидных связей белка.



Рис. 2.18. Введение сульфгидрильных групп путём модификации аминогрупп с помощью N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетата (SATA).

Таким образом, SATA может быть использован для введения SH-групп на поверхность антител и последующего конъюгирования с белками, активированными малеимидом.

2.5. Применение пероксидазы табака для создания биосенсоров

Биосенсоры – биоаналитические устройства, преобразующие сигнал от от биоселективного элемента с помощью преобразователя в измеряемый сигнал (например, ток). В качестве биологического компонента чаще всего применяются ферменты, но также могут использоваться антитела, нуклеиновые кислоты, органеллы, микроорганизмы, ткани и т.д. При этом биораспознающий элемент находится в непосредственным контакте с преобразователем первичного сигнала. Основным преимуществом биосенсоров является их специфичность, а также низкие затраты энергии (анализ проводится при нормальных температурах, низких потенциалах и т.д.).

Наиболее часто для преобразования первичного сигнала от биологического элемента применяются электрохимические методы, В частности, потенциометрические или амперометрические. В последнем случае происходит измерение тока восстановления или окисления электроактивных молекул, возникающих в результате распознавания аналита. Амперометрическая детекция широко применяется на практике благодаря своей простоте, высокой чувствительности и широкому линейному диапазону определения.

Принцип работы первых амперометрических биосенсоров был основан на детекции снижения концентрации субстратов или увеличения концентрации продуктов ферментативной реакции (т.н. «биосенсоры первого поколения»). Примером для данного типа биосенсоров может служить сенсор на основе глюкозоксидазы. В этом случае субстратом является O_2 , а продуктом реакции – H_2O_2 . Детекция при этом проводится по току восстановления на электроде образующегося H_2O_2 . Существенными недостатками данного биосенсора являются низкая растворимость O_2 и связанные с этим диффузионные ограничения и плохая воспроизводимость (из-за различий в концентрации O_2), а также необходимость прикладывать большой потенциал (что приводит к протеканию различных побочных окислительно-восстановительных процессов).

- 55 -

Введение в анализируемую смесь различных молекул-медиаторов, которые участвуют в переносе электронов между активным центром фермента и электродом, позволяет существенно снизить значение рабочего потенциала. Биосенсоры, в работе которых используется медиаторный перенос электронов, получили название «биосенсоров второго поколения». Впервые данный подход был применён Kulys и Svirmickas в 1980 году [216]. Несколько позже (в 1984 г.) Cass с соавт. использовали ферроцен для создания медиаторного биосенсора на основе глюкозоксидазы [217], который впоследствии стал первым коммерческим биосенсором для определения уровня глюкозы в крови. Соединения, выполняющие медиаторов, роль должны удовлетворять ряду условий: ИХ окисление/восстановление должно быть обратимым, окисленная и восстановленная формы должны быть стабильны, окислительно-восстановительный потенциал должен быть сопоставим с ферментативной реакцией. Кроме того, медиатор не должен быть токсичным. Главным недостатком использования медиаторов является их «вымывание» из реакционной смеси при многократном использовании биосенсора или при хранении, что приводит к ухудшению характеристик биосенсора.

В последнее время всё большее внимание в различных исследовательских работах уделяется безреагентным биосенсорам, основанным на прямом переносе электронов между активным центром фермента и поверхностью электрода («биосенсоры третьего поколения») [218]. К третьему поколению относятся и биосенсоры, в которых перенос происходит после предварительной модификации поверхности электрода. Основным ограничением для ферментов, определяющим возможность существования прямого переноса электронов, является близкое расположение активного центра к поверхности глобулы. Наличие прямого переноса было показано для ряда пероксидаз, в том числе для HRP C [219–221], СсР [222], лактопероксидазы [223], хлоропероксидазы [224] и пероксидазы батата [225]. В нашей лаборатории наличие прямого переноса электронов было также показано для ТОР. Был опубликован ряд работ, посвящённых изучению

- 56 -

электрокаталитических свойств как нативной, так и рекомбинантной TOP [79,225–228].

Первое исследование, посвящённое сравнению электрохимических свойств нативной ТОР с HRP C и пероксидазой батата (SPP), показало, что пТОР во многом уступает HRP C и SPP. Так, безмедиаторный биосенсор на основе SPP имел больший предел обнаружения H_2O_2 (11, 71 и 136 нМ H_2O_2 для SPP, HRP C и пТОР, соответственно), а также более высокую чувствительность (56, 25 и 21 мкА/мМ для SPP, HRP C и пТОР, соответственно) [225]. В то же время биосенсор на основе пТОР обеспечивал больший линейный диапазон определения (0,5-240 для nTOP, 0,5-130 для HRP C и 0,5-60 для SPP) [225]. При иммобилизации nTOP в электропроводящем гидрогеле (медиаторный перенос), характеристики полученного биосенсора были несколько лучше (чувствительность – 139 мкА/мМ и предел обнаружения – 81 нМ H_2O_2) [225].

Изучение кинетических характеристик прямого переноса электронов для nTOP, адсорбированной по поверхности графитового электрода показало, что в прямом переносе участвует лишь половина молекул фермента (68 ± 10 %) [229]. Сходный результат был получен при иммобилизации nTOP на поверхности золотого электрода (52 ± 10 %) [226]. Так как при адсорбции ориентация молекул фермента на поверхности электрода носит случайный характер, а также учитывая то, что гем находится достаточно глубоко в полости TOP, данный результат говорит о существовании путей переноса электронов внутри полипептидной цепи. Также были определены значения константы скорости переноса электронов – k_s – для nTOP, HRP C, SPP и пероксидазы арахиса. Скорость прямого переноса электронов для nTOP заметно уступала SPP ($k_s = 2,6 \pm 1,0$ и $4,8 \pm 2,3$ с⁻¹, соответственно), но была лучше, чем у HRP C ($k_s = 1,9 \pm 0,3$ с⁻¹) [229].

Так как при прямом переносе электронов между активным центром фермента и поверхностью электрода большое значение имеет расстояние между ними, присутствие углеводов на поверхности фермента оказывает негативное действие на эффективность переноса. Так, сравнение свойств рекомбинантной

- 57 -

негликозилированной и нативной HRP C, содержание олигосахаридов для которой составляет около 25 % от массы фермента, показало, что доля молекул фермента, участвующих в прямом переносе электронов, выше в случае рекомбинантного фермента по сравнению с нативным (63 и 48 %, соответственно). Также значительно выше скорость переноса электронов (значение k_s возросло с 1,9 с⁻¹ до 7,6 с⁻¹). Поэтому после получения рекомбинантной ТОР было проведено сравнение её электрокаталитических свойств со свойствами нативного фермента. В отличие от HRP C доля молекул гТОР, участвующих в прямом переносе электронов, в проведённом исследовании лишь незначительно отличалась от nTOP (89 ± 3 и 82 ± 1 %, соответственно) [228]. Скорость же переноса электронов для гТОР, адсорбированной на поверхности графитового электрода, была выше примерно в 3 раза по сравнению с nTOP ($k_s = 35$ и 12 с⁻¹, соответственно) [228]. Менее выраженное улучшение электрохимических характеристик в случае гТОР может быть связано с меньшей степенью гликозилирования nTOP (8-10 %) по сравнению с HRP C.

Известно, что эффективность прямого переноса электронов зависит от различных факторов, таких как расстояние между активным центром фермента и электродом, ориентация фермента, способ иммобилизации и т.д. В работах по изучению электрохимических свойств ТОР был использован метод физический адсорбции фермента на электроде. Однако известно, что при физической адсорбции зачастую происходят сильные конформационные изменения в структуре ферментов и их денатурация [230-233]. Кроме того, данный процесс является обратимым и при использовании биосенсора может происходить десорбция Поэтому иммобилизованного фермента. представляет интерес изучение химической иммобилизации ТОР, которая может привести к улучшению характеристик безреагентных биосенсоров на её основе.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Материалы

В работе были использованы следующие реактивы: 2,2-азино-бис(3-этилтиазолин-6-сульфонат) аммония (ABTS), гваякол, фенол, 4-аминоантипирин, ацетат натрия, уксусная кислота, гидрофосфат калия, дигидрофосфат натрия, соляная кислота, додецилсульфат натрия (SDS), хлорид кальция, гемин, дитиотреитол (DTT), окисленный глутатион (GSSG), мочевина (ultra pure), изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (IPTG), канамицин, тетрациклин, хлорамфеникол, трис(гидроксиметил)аминометан (Tris), пероксид водорода, люминол, *п*-йодфенол, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDAC) и N-гидроксисукцинимид (sulfo-NHS) фирмы «Sigma-Aldrich» (США); динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) фирмы «AppliChem» (США); глицерин (99,9%, ultra pure) и хлорид натрия фирмы «Fluka/BioChemika»; бактотриптон, дрожжевой экстракт и агар фирмы «Difco» (США); глюкоза фирмы «РеаХим» (Россия); 30% раствор акриламида/бис-акриламида (29:1), N,N,N',N'тетраметилэтилендиамин (TEMED) и 2-меркаптоэтанол фирмы «Bio-Rad» (США); глицин фирмы «Merck» (Германия); N-сукцинимидил-S-ацетил-тиоацетат (SATA) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (sulfo-SMCC) фирмы «Thermo Scientific Pierce» (США).

Для экспрессии в клетках *E. coli* были использованы плазмиды pTOP (с геном пероксидазы табака дикого типа, предоставленным профессором Марком Лагримини¹) и pTOP-F140Y, полученные ранее к.х.н. Савицким П.А. и к.х.н. Рожковой А.М. [234] на основе плазмиды pET-40b(+) («Novagen», CША). Экспрессию проводили в штаммах *E. coli* BL21(DE3) CodonPlusp/LysS и *E. coli* BL21(DE3) Rosetta/pLysS. Для культивирования клеток *E. coli* использовали среду 2xYT (16 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л хлорида натрия, pH 7,0).

¹ Mark Lagrimini, Head of Department of Agronomy and Horticulture, University of Nebraska-Lincoln, 279 Plant Science Lincoln, NE, USA

Для получения конъюгатов с пероксидазой табака использовались поликлональные иммуноглобулины класса G козы к иммуноглобулинам мыши фирмы «ИМТЕК» (Россия) со следующими параметрами специфичности: IgG мыши – 100%; IgM мыши – 90%; IgA мыши – 85%; IgG, IgM, IgA человека – менее 5%.

Для проведения иммуноферментного анализа с использованием полученных конъюгатов антител с рекомбинантной пероксидазой табака и колориметрической детекцией за основу был взят коммерческий набор для определения содержания иммуноглобулинов мыши «FastELISA» фирмы «RD-Biotech» (Франция). Для проведения иммуноферментного анализа с хемилюминесцентной детекцией был использован белый непрозрачный полистироловый планшет с преадсорбированными антителами фирмы «Thermo Scientific Pierce» (США).

3.2. Методы

3.2.1. Трансформация клеток *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus/pLysS и *E. coli* BL21(DE3)Rosetta/pLysS плазмидной ДНК

Клетки культивировали в толстостенных пробирках, содержащих 4 мл среды 2хҮТ, 8 мкг/мл тетрациклина и 25 мкг/мл хлорамфеникола, на качалке «Inforce 2» (Швейцария) при 37°C и 180 об/мин. Через 12-14 часов отбирали 40 мкл культуральной жидкости и переносили в 4 мл свежей среды того же состава и инкубировали в течение 2 часов при 37°С и 180 об/мин. Клетки осаждали на центрифуге «Eppendorf 5403» (5000 об/мин, 5 мин при 4° C). Супернатант удаляли, а осадок клеток ресуспендировали в 1 мл охлаждённого стерильного 50 мМ раствора CaCl₂ и инкубировали на льду 30 мин. После этого клетки снова центрифугированием, осаждали суспендировали В 100 мкл охлаждённого стерильного 50 мМ раствора CaCl₂ и инкубировали на льду в течение 4 часов. Затем к суспензии клеток добавляли 1 мкл раствора плазмидной ДНК, с геном ТОР дикого типа или TOP-F140Y. Суспензию перемешивали с помощью автоматической пипетки и инкубировали 40 мин на льду. Далее клетки подвергали

- 60 -

тепловому шоку (90 сек в водном термостате при 42°С), после чего 3 мин охлаждали на льду. Полученные трансформированные клетки суспендировали в 900 мкл среды 2хҮТ без добавления антибиотиков в пробирке и инкубировали при перемешивании 1,5 часа при 37°С. Затем клетки высевали на чашки Петри с агаризованной (1,2%) средой 2хҮТ, содержащей 34 мкг/мл хлорамфеникола и 30 мкг/мл канамицина, и инкубировали при 37°С в течение 12-14 часов.

3.2.2. Модификация условий культивирования штаммов *E.coli* BL21(DE3)CodonPlus/pLysS и *E.coli* BL21(DE3)Rosetta/pLysS – продуцентов рекомбинантной пероксидазы табака

Подбор условий культивирования для повышения выхода rTOP проводили в два этапа. На первом этапе варьировали температуру и время культивирования, а также время внесения индуктора. На втором этапе варьировали состав среды (содержание глицерина, KH₂PO₄ и Na₂HPO₄).

колонии трансформированных клеток *E. coli* Единичные BL21(DE3) CodonPlusp/LysS и E. coli BL21(DE3) Rosetta/pLysS культивировали в 4 мл среды 2хҮТ, содержащей 30 мкг/мл канамицина и 34 мкг/мл хлорамфеникола, при 31°С и 180 об/мин в течение ночи. Далее отбирали по 100 мкл культуральной жидкости и переносили в 20 мл среды того же состава, находящейся в качалочной колбе (объёмом 100 мл) с отбойниками, и проводили культивирование при 31°С и 100 об/мин. Когда поглощение при 600 нм достигало 0,6 - 1,0 проводили индукцию экспрессии гена пероксидазы табака добавлением в среду IPTG до конечной концентрации 0,2 мМ. После этого клетки культивировали при 20 или 27°С в течение 6 или 16 часов, периодические отбирая пробы по 1 мл. Рост клеток контролировали спектрофотометрически по поглощению при 600 нм. Контроль за уровнем экспрессии осуществляли с помощью аналитического электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Количество целевого белка определяли площади соответствующего по пятна на электрофореграмме с использованием программного обеспечения «VisionWorksLS Analysis Software» компании «UVP» (США).

- 61 -

После выбора наиболее подходящего штамма и условий его культивирования, было исследовано влияние добавления фосфатов и глицерина на выход гТОР с 1 л среды. Клетки культивировали в питательной среде, содержащей различные концентрации KH₂PO₄ и Na₂HPO₄ и глицерина; через 10 часов после индукции экспрессии определяли поглощение при 600 нм и содержание гТОР.

3.2.3. Экспрессия пероксидазы табака в клетках *E.coli* BL21(DE3)CodonPlus/pLysS

Для экспериментов по оптимизации рефолдинга, конъюгированию с антителами и созданию биосенсоров rTOP экспрессировали в клетках E. coli BL21(DE3)CodonPlus/pLysS. Единичную колонию трансформированных клеток переносили в 4 мл среды 2xYT (16 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта и 5 г/л хлорида натрия, рН 7,0) в присутствии 30 мкг/мл канамицина и 34 мкг/мл хлорамфеникола. После культивирования в течение ночи при 180 об/мин и 31 °С из пробирки отбирали 1 мл культуральной среды и переносили в 200 мл свежей среды аналогичного состава, находящейся в качалочной колбе объёмом 1 литр с отбойниками. Культивирование проводили при 31 °C и 100 об/мин. Когда поглощение клеток при 600 нм достигало значения 1,0, проводили индукцию экспрессии гена пероксидазы табака дикого типа или её мутантной формы ТОР-F140Y добавлением в культуральную среду IPTG до конечной концентрации 0,2 мМ. После индукции культивирование проводили в течение 6 часов при 27°С и 100 об/мин. После завершения культивирования клетки осаждали центрифугированием в течение 10 минут при 5000 g и 4 °C на центрифуге «Eppendorf 5804». Полученный осадок клеток хранили при -20 °С.

3.2.4. Выделение и солюбилизация телец включения

Клетки *E. coli*, полученные с 200 мл культуральной среды (около 0,5 г сырой биомассы) и содержащие rTOP или rTOP-F140Y, ресуспендировали в 40 мл 2 М раствора хлорида натрия, содержащего 10 мМ дитиотреитол (DTT). Далее клетки разрушали ультразвуком на установке «Sonifier 250» фирмы «Branson Ultrasonics»

- 62 -

(США) при 22 кГц (3 раза по 3 мин с трехминутными интервалами на льду). Разрушенные клетки инкубировали на льду в течение 30 мин, после чего снова обрабатывали ультразвуком. Затем смесь инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Далее тельца включения осаждали с помощью центрифугирования при 20 000 g и 15 °C в течение 15 мин на центрифуге «Eppendorf 5403». Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 40 мл 0,1 M Tris-HCl буфера (pH 8,5), содержащего 10 мМ DTT, после чего снова осаждали при 20 000 g и 15 °C в течение 15 мин. Супернатант снова удаляли, а процедуру промывки осадка повторяли ещё два раза. Чистоту отмытых телец включения контролировали с помощью аналитического электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS (см. раздел 3.2.8). Полученный осадок телец включения солюбилизировали в течение 1,5-2 часов в 50 мл 0,1 M Tris-HCl буфера (pH 8,5) с добавлением 6 М мочевины и 1 мМ DTT при 4 °C и периодическом перемешивании.

3.2.5. Оптимизация условий рефолдинга рекомбинантной пероксидазы табака

Рефолдинг rTOP дикого типа осуществлялся двумя методами: методом быстрого разведения в рефолдинг-среде и с использованием гель-фильтрационной хроматографии.

На первом этапе были определены оптимальные условия рефолдинга rTOP стандартным методом разведения. Для этого была проведена серия экспериментов, в которых было изучено влияние различных параметров процесса на выход активного фермента. Оптимизацию проводили на небольших количествах солюбилизированных телец включения и рефолдинг-среды (конечный объём 10 мл в 15 мл пробирках). В ходе оптимизации варьировали состав рефолдинг-среды: концентрации GSSG (0,3-0,7 мМ), DTT (0,05-0,4 мМ), мочевины (0-2,25 M), CaCl₂ (0,5-6 мМ), белка (4-80 мкг/мл) и гемина (1-5 мкМ) в 0,1 М Tris-HCl буфер с различным значением pH (pH 8-9,6 при 4°C). Также варьировали время добавления гемина (через 24-96 часов после внесения солюбилизированного апо-фермента в рефолдинг-среду). Концентрация глицерина (5%) оставалась неизменной во всех

- 63 -

экспериментах. Солюбилизированный апо-фермент вносился по каплям при постоянном перемешивании в предварительно охлажденную до 4°C рефолдингсреду, не содержащую гемин. Через 24-96 часов инкубации в раствор добавляли гемин до конечной концентрации 1-5 мкМ (концентрацию гемина определяли по поглощению при 385 нм, используя коэффициент экстинкции 58,4 мМ⁻¹см⁻¹). Сразу после добавления гемина через определённые промежутки времени измеряли активность в рефолдинг-среде по отношению к ABTS (см. раздел 3.2.10) вплоть до прекращения роста активности. Для сравнения эффективности рефолдинга при различных параметрах процесса использовали значения активности, определённые через 24 ч после внесения гемина в среду.

Рефолдинг rTOP с использованием гель-фильтрационной хроматографии проводили на колонке размером 0,9*22 см с Toyopearl HW-55, уравновешенной рефолдинг-средой следующего состава: 0,1 М Tris-HCl буфер, pH 9,6, содержащий 0,1 М мочевину, 0,3 мМ GSSG, 0,05 мМ DTT, 5 мМ CaCl₂ и 5% глицерин. Объем образца (солюбилизированных в 6 М мочевине телец включения) равнялся 300 мкл, а начальная концентрация белка – 0,2 или 0,8 мг/мл. Хроматографию проводили при скорости потока 0,2 или 0,4 мл/мин. Объем собранных фракций составлял 0,4 мл. Гемин вносили во фракции либо сразу после завершения хроматографии, либо после 24-часовой инкубации при 4 °С. Собранные аликвоты анализировали с помощью аналитического электрофореза в ПААГ в присутствии SDS. Для сравнения со стандартной методикой параллельно проводили рефолдинг rTOP методом разведения в 50 мл рефолдинг-среды того же состава; объем солюбилизированных телец включения составлял 300 мкл (0,8 мг белка/мл), конечная концентрация белка в рефолдинг-среде –16 мкг/мл; гемин вносили либо сразу после добавления апо-фермента, либо через 24 ч предварительной инкубации (то есть одновременно с добавлением в собранные в процессе гель-фильтрации фракции). Во всех случаях после внесения гемина в образцы через определённые промежутки времени измеряли активность по отношению к ABTS вплоть до

прекращения её роста. Для сравнения двух методик использовали значения суммарной активности.

3.2.6. Рефолдинг рекомбинантной пероксидазы табака при оптимальных условиях

После оптимизации условий рефолдинга гТОР был проведён контрольный эксперимент для определения выхода целевого белка на каждой стадии процесса от выделения из клеток до очистки. Для этого были выделены тельца включения из 0,44 г сырой биомассы, полученной из 200 мл культуральной среды. Далее тельца включения солюбилизировали в 50 мл 6 М мочевины с 1 мМ DTT (см. раздел 3.2.4) и вносили по каплям при непрерывном перемешивании в 2,75 л предварительно охлаждённой рефолдинг-среды оптимизированного состава: 0,3 мМ GSSG, 0,05 мМ DTT, 5 мМ CaCl₂ и 5% глицерин в 0,1 М Tris-HCl буфере, pH 9,6 (4°C). 2 часа инкубации при 4°С в рефолдинг-среду Через при постоянном перемешивании добавляли гемин до конечной концентрации 1 мкМ. Мониторинг ренатурации осуществляли, измеряя через определённые промежутки времени активность в рефолдинг-среде по отношению к ABTS (см. раздел 3.2.10). После окончания ренатурации рефолдинг-среду концентрировали с использованием ультрафильтрационной ячейки «Amicon» объемом 400 мл (мембрана YM-10). 50 мл. Объём концентрата составил около Далее проводили очистку ренатурированной rTOP.

3.2.7. Очистка ренатурированной пероксидазы табака

Очистку концентрированного раствора rTOP после рефолдинга проводили путём двухстадийной гель-фильтрации. На первом этапе концентрат холофермента объёмом по 10-12 мл наносили на колонку размером 5*50 см с Toyopearl HW-55, уравновешенную 0,1 М Tris-HCl (pH 8,5). Элюцию проводили при скорости потока 2 мл/мин. Объём фракций составлял 3 мл. Для собранных фракций измеряли спектр поглощения В диапазоне 220-660 нм на фирмы «Shimadzu» спектрофотометре «UV-2401» (Япония) и определяли

- 65 -

каталитическую активность ПО отношению к ABTS. Активные фракции объединяли и концентрировали на ультрафильтрационной ячейке «Amicon» объемом 50 мл через мембрану YM-10. Полученный концентрат (около 8 мл) размером 2,5*90 см с Toyopearl HW-55, повторно очищали на колонке уравновешенной 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5). Фермент элюировали при скорости потока 1,5 мл/мин. Объём фракций составлял 3 мл. Для собранных фракций спектр поглощения диапазоне 220-660 нм определяли измеряли В И каталитическую активность с ABTS в качестве субстрата. Активные фракции объединяли и концентрировали а ультрафильтрационной ячейке «Amicon» объемом 50 мл через мембрану ҮМ-10.

3.2.8. Электрофорез в полиакриламидном геле

Аналитический электрофорез в денатурирующих условиях по методу Laemmli [235] проводили на приборе «Emperor Penguin Dual Gel Electrophoresis Systems» фирмы «Thomas Scientific» (США).

Для этого использовались следующие растворы: буфер A (1 M Tris-HCl, pH 8,8), буфер Б (1 M Tris-HCl, pH 6,8), раствор мономеров (29% акриламида и 1% бис-акриламида); 10% раствор SDS; 10% раствор персульфата аммония; буфер для нанесения образцов, маркеры молекулярной массы, раствор для окраски геля «Coomassie Brilliant Blue R-250» фирмы «Bio-Rad» (США); раствор для отмывки геля (40% этанола, 10% уксусной кислоты).

Состав разрешающего геля (12,5%): 9,38 мл буфера А; 250 мкл 10% SDS; 4,72 мл dH₂O; 10,4 мл смеси мономеров; 20 мкл TEMED; 250 мкл 10% персульфата аммония. Состав концентрирующего геля (5%): 0,88 мл буфера Б; 70 мкл 10% SDS; 4,76 мл dH₂O; 1,16 мл смеси мономеров; 7 мкл TEMED; 70 мкл 10% персульфата аммония.

Образцы, смешанные в соотношении 1:1 с буфером для нанесения образцов, инкубировали в термостате «Гном» фирмы «ДНК-Технология» (Россия) при 98°С в течение 10 минут. Электрофорез проводили в условиях, рекомендованных фирмойизготовителем, при постоянном токе 40 мА в течение 90 минут. Для визуализации полос белка гель помещали в раствор для окрашивания и инкубировали в течение ночи на орбитальном шейкере «PSU-10i» фирмы «Biosan» (Латвия) при 60 об/мин. Далее гель отмывали в растворе для отмывки (3 раза по 20 мин в свежей порции отмывки). Чувствительность окраски с помощью Coomassie R-250 составляет около 1 мкг белка в полосе.

3.2.9. Определение концентрации белка

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [236], а также спектрофотометрически по эмпирической формуле [237] :

с (мкг/мл) = 183 A₂₃₀ – 75,8 A₂₆₀

Концентрацию холо-фермента определяли по поглощению при 403 нм, используя коэффициент экстинкции 108 мМ⁻¹см⁻¹ [78].

3.2.10. Фотометрическое определение активности пероксидазы табака

Мониторинг ферментативной активности в процессе *in vitro* ренатурации, очистки И термоинактивации осуществляли, определяя активность с использованием ABTS в качестве субстрата [238]. Реакционная смесь содержала 0,36 мМ ABTS и 5 мМ H₂O₂ в 0,1 М Na-ацетатном буфере (pH 4,5). Концентрацию H₂O₂ определяли по поглощению на 240 нм, используя коэффициент экстинкции 43,6 М⁻¹см⁻¹ [239]. Скорость реакции определяли по изменению поглощения при 405 нм, используя коэффициент экстинкции окисленного ABTS 36,8 мМ⁻¹см⁻¹ [22]. Измерения проводили при 25°С на спектрофотометре «UV-2401» фирмы «Shimadzu» (Япония). Единицу ферментативной активности (Е) определяли как количество фермента, необходимого для превращения 1 мкмоль субстрата за 1 минуту при описанных условиях измерения. Измерения активности проводили не менее, чем в трёх повторах.

Активность по отношению к гваяколу определяли при следующих условиях: реакционная смесь содержала 2,25 мМ гваякола и 5 мМ H₂O₂ в 0,1 М К-фосфатном буфере, pH 7,0; измерения проводили при 25°, используя коэффициент экстинкции на 470 нм, равный 5570 М⁻¹см⁻¹ [240].

- 67 -

Для смеси фенол/4-аминоантипирин: реакционная смесь содержала 10 мМ фенола, 0,1 мМ 4-аминоантипирина и 5 мМ H₂O₂ в 0,1 М К-фосфатном буфере, рН 7,0; коэффициент экстинкции продукта окисления на 510 нм был принят равным 6580 М⁻¹см⁻¹ [241].

3.2.11. Реакция окисления люминола

Исследование хемилюминесцентной реакции окисления люминола, катализируемой rTOP, проводили следующим образом: в ячейки объемом 300 мкл 96-луночного непрозрачного белого микропланшета вносили по 150 мкл 0,1 М Tris-HCl буфера (pH 8,3), 25 мкл 10 мМ раствора люминола и 25 мкл раствора фермента. Реакцию инициировали добавлением 50 мкл 10 мМ раствора H₂O₂. 25 °C Интенсивность люминесценции измеряли при на планшетном мультидетекторе «Anthos Zenyth 3100» фирмы «BioChrom» (Великобритания).

Для сравнения измеряли интенсивность люминесценции в реакции окисления люминола в присутствии HRP C. В случае HRP C реакцию проводили в присутствии усилителя – *n*-йодфенола (реакция усиленной хемилюминесценции). Реакционная смесь включала 125 мкл 0,1 M Tris-HCl буфера (pH 8,5), 25 мкл 10 мМ раствора люминола, 25 мкл раствора фермента и 25 мкл 10 мМ раствора *n*-йодфенола. Реакцию инициировали внесением 50 мкл 10 мМ H₂O₂.

3.2.12. Влияние ионов кальция на свойства рекомбинантной пероксидазы табака

Для изучения влияния ионов кальция на каталитическую активность rTOP фермент инкубировали в 0,1 M Tris-HCl буфере (pH 8) в присутствии различных концентраций CaCl₂ при комнатной температуре в течение 15 мин. После этого проводили измерение каталитической активности по отношению к различным субстратам (см. разделы 3.2.10 и 3.2.11). Для изучения изменений в каталитических свойствах фермента в результате потери эндогенных ионов кальция rTOP инкубировали при комнатной температуре в 0,1 M Tris-HCl буфере (pH 8) в

присутствии различных концентраций EDTA в течение 80 мин и через определённые промежутки времени измеряли активность по отношению к ABTS.

Для изучения влияния ионов кальция на термостабильность гТОР фермент инкубировали в 0,1 М Tris-HCl, буфере (pH 7,0) в присутствии различных концентраций CaCl₂ при 52°C. Аликвоты фермента объемом 50 мкл помещали в тонкостенные пластиковые пробирки объемом 0,5 мл. Пробирки инкубировали в термостате «Гном» фирмы «ДНК-Технология» (Россия) и через определенные интервалы времени отбирали по одной пробирке, помещали её на 10 мин на лёд для исключения эффектов обратимой инактивации. Затем пробы центрифугировали 5 мин при 15 000 об/мин и измеряли величину остаточной активности фермента по отношению к ABTS.

3.2.13. Конъюгация антител и рекомбинантной пероксидазы табака с использованием SATA и sulfo-SMCC

Конъюгация поликлональных иммуноглобулинов класса G козы к иммуноглобулинам мыши (GAM-IgG) и rTOP (или rTOP F140Y) с использованием SATA проводили согласно методике, изложенной в [205].

Сначала с помощью гель-фильтрации (колонка 1x5 см, Sephadex G-25) GAM-IgG переводили в раствор, содержащий 0,1 М фосфат натрия и 0,15 М NaCl (pH 7,2). Далее активировали антитела: к 250 мкл раствора GAM-IgG (1 мг/мл) добавляли 10 мкл раствора SATA (8 мг/мл в ДМФА) и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем проводили деацетилирование: к смеси добавляли 30 мкл раствора, содержащего 0,5 М NH₄OH·HCl и 10 мМ EDTA в PBS (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,76 мМ KH₂PO₄, pH 7,4) и инкубировали 2 часа при комнатной температуре. За 30 мин до окончания деацетилирования модифицированных GAM-IgG активировали rTOP (или rTOP F140Y): к 300 мкл раствора фермента (1,7 мг/мл в PBS) добавляли 25 мкл раствора sulfo-SMCC (1 мг/мл) и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Параллельно уравновешивали колонку с Sephadex G-25 раствором PBS, содержащим 10 мМ EDTA. После окончания реакции деацетилирования на

- 69 -

этой колонке очищали активированные GAM-IgG. Затем колонку уравновешивали раствором PBS без добавления EDTA и очищали на ней активированный фермент. Полученные после очистки растворы функционализированных GAM-IgG и rTOP (или rTOP-F140Y) объединяли и инкубировали в течение ночи при 4°C.

3.2.14. Изучение влияния модификации рекомбинантной пероксидазы табака с использованием sulfo-SMCC на активность фермента по отношению к люминолу

К раствору rTOP с концентрацией 2,1 мг/мл в PBS добавляли 40-кратный молярный избыток sulfo-SMCC. Через определённые промежутки времени отбирали аликвоты по 10 мкл и переносили в пробирки с 90 мкл 10 мг/мл BSA, чтобы остановить модификацию rTOP. Также готовили три контрольных образца: 1) 90 мкл 10 мг/мл BSA и 10 мкл PBS (для определения фоновой люминесценции); 2) 90 мкл 10 мг/мл BSA и 10 мкл 2,1 мг/мл rTOP без добавления sulfo-SMCC (для определения возможного влияния BSA на окисление люминола в присутствии rTOP); 3) 90 мкл PBS и 2,1 мг/мл rTOP без добавления sulfo-SMCC. Затем измеряли интенсивность люминесценции: в лунки белого непрозрачного полистиролового планшета вносили по 150 мкл 0,1 M Tris-HCl (pH 8,3), 25 мкл 10 мМ люминола и 25 мкл образцов (непосредственно перед измерением пробы разводили в 100 раз). Реакцию инициировали внесением в лунки 50 мкл 10 мМ H_2O_2 . Интенсивность люминесценции измеряли при 25°C на планшетном мультидетекторе «Anthos Zenyth 3100» фирмы «BioChrom» (Великобритания).

3.2.15. Иммуноанализ с использованием конъюгатов рекомбинантной пероксидазы табака с антителами

Полученные конъюгаты rTOP и rTOP-F140Y с антителами использовали для проведения иммуноанализа. Детекцию осуществляли двумя способами: колориметрическим и хемилюминесцентным.

За основу был взят коммерческий набор «FastELISA» фирмы «RD-Biotech» (Франция) для определения содержания IgG мыши. Анализ проводили согласно

инструкции производителя. В лунки вносили по 20 мкл стандартных образцов (концентрация IgG мыши 20-1900 нг/мл). Далее вносили по 100 мкл конъюгата поликлональных IgG против иммуноглобулинов мыши с HRP C (HRP-IgG), входящего в набор, или синтезированных нами конъюгатов rTOP-IgG и rTOP-F140Y-IgG. После 15-минутной инкубации при комнатной температуре лунки промывали 3 раза 0,05% раствором Tween 20. Затем в лунки вносили по 100 мкл готовой субстратной смеси (TMB и H_2O_2). Через 15 минут инкубации при комнатной температуре в лунки планшета добавляли по 100 мкл «стоп-раствора» и измеряли поглощение при 450 и 620 нм на планшетном мультидетекторе «Anthos Zenyth 3100» фирмы «BioChrom» (Великобритания). Для каждого из конъюгатов измерения проводились в трёх повторах. На основании усреднённых данных по разнице поглощений (A_{450} - A_{620}) были построены калибровочные кривые.

Также был проведён хемилюминесцентный иммуноанализ. Для этого был использован белый непрозрачный микропланшет фирмы «Thermo Scientific» (США) с преадсорбированными антимышиными антителами. В лунки планшета вносили по 20 мкл стандартных образцов (20-1900 нг/мл мышиных IgG). Далее добавляли по 100 мкл HRP-IgG, входящего в набор «FastELISA», или полученных нами rTOP-IgG и rTOP-F140Y-IgG. После 15-минутной инкубации при комнатной температуре лунки промывали 3 раза 0,05% раствором Tween 20 и затем в них вносили субстратную смесь. Измерения проводили при оптимальных для каждого фермента условиях. Для конъюгатов IgG с rTOP и rTOP-F140Y в лунки вносили по 175 мкл 0,1 M Tris-HCl буфера (pH 8,3) и 25 мкл 10 мМ раствора люминола. Для HRP-IgG в лунки вносили по 150 мкл 0,1 M Tris-HCl буфера (pH 8,5), 25 мкл 10 мМ раствора люминола и 25 мкл 10 мМ раствора n-йодфенола. Реакцию инициировали добавлением 50 мкл 10 мМ H₂O₂. Интенсивность люминесценции измеряли при 25°C на планшетном мультидетекторе «Anthos Zenyth 3100».

3.2.16. Иммобилизация рекомбинантной пероксидазы табака на электроде

Фермент иммобилизовали на дисковом электроде (0,07 см²) из высокоориентированного пиролитического графита фирмы «Mineral Technologies»

- 71 -

(США). Перед иммобилизацией поверхность электрода полировали с помощью наждачной бумаги P2400, промывали бидистиллированной водой и высушивали в потоке аргона.

Иммобилизацию гТОР на электроде проводили тремя различными способами. Физическую адсорбцию осуществляли посредством нанесения 17 мкл раствора фермента (0,11 мг/мл) в 10 мМ Na-фосфатном буфере (pH 6,0) на поверхность электрода с последующей инкубацией при 4°C в течение 20 ч.

Химическую иммобилизацию rTOP проводили либо с предварительной активацией поверхности электрода, либо без неё. В первом случае на поверхность электрода наносили 4,5 мкл 20 мМ sulfo-NHS и 5,5 мкл 40 мМ EDAC в 10 мМ Na-фосфатном буфере (pH 6,0), после чего инкубировали в течение 20 ч при 4°C [242]. Затем электрод промывали бидистиллированной водой и высушивали в потоке аргона. После этого на электрод наносили 17 мкл раствора фермента (0,11 мг/мл) в 10 мМ Na-фосфатном буфере (pH 6,0) и инкубировали в течение 20 часов при 4°C. Во втором случае (без предварительной активации поверхности электрода) на поверхность электрода одновременно наносили 4,5 мкл 20 мМ sulfo-NHS, 5,5 мкл 40 мМ EDAC и 7 мкл раствора фермента (0,26 мг/мл) в 10 мМ Na-фосфатном буфере (pH 6,0) и инкубировали в течение 20 часов при 4°C.

Во всех трёх вариантах после завершения иммобилизации фермента электрод тщательно промывали бидистиллированной водой и буферным раствором (20 мМ Na-фосфатным буфером).

3.2.17. Определение электрохимических параметров биосенсоров на основе рекомбинантной пероксидазы табака

Вольтамперометрические измерения с линейной развёрткой потенциала проводили с помощью потенцио-/гальваностата «Autolab PGSTAT 30» фирмы «Ecochemie» (Нидерланды) в атмосфере аргона в термостатируемой трёхэлектродной ячейке. Электродный потенциал задавался по отношению к хлорсеребряному электроду сравнения Ag/AgCl (в насыщенном растворе NaCl); в качестве вспомогательного электрода использовалась платиновая пластина.
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первой части данной работы представлены результаты экспериментов по повышению продукции рекомбинантной пероксидазы табака (rTOP) в клетках *E. coli* и эффективности ренатурации rTOP *in vitro*, а также влиянию ионов кальция на свойства фермента. Вторая часть работы сфокусирована на биотехнологическом применении rTOP, как в качестве ферментной метки для иммуноанализа, так и в качестве компонента для создания биосенсоров.

4.1. Модификация условий экспрессии рекомбинантной пероксидазы табака

Ha этапе работы было изучено влияние ряда первом параметров культивирования штаммов-продуцентов на экспрессию rTOP. Было проведено сравнение экспрессии rTOP в двух штаммах E. coli BL21-CodonPlus(DE3)pLysS и Rosetta(DE3)pLysS при разном времени внесения индуктора (изопропил-β-Dтиогалактопиранозида; IPTG) и температуре культивирования после индукции. Так как rTOP экспрессируется в клетках E. coli в нерастворимой форме в виде телец включения, количество фермента контролировали с помощью SDS-электрофореза, оценивая по площади соответствующего пятна на электрофореграмме (пример приведён на рис. 4.1) с использованием программного обеспечения «VisionWorks LS Analysis Software» компании «UVP» (США).



Рис. 4.1. Электрофореграмма белков в денатурирующих условиях в 12,5% полиакриламидном геле. М – маркеры молекулярного веса (кДа); 1 – клетки *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)pLysS до индукции; 2, 3, 4 – клетки *E. coli* через 2, 4 и 6 часов после индукции экспрессии пероксидазы табака, соответственно.

На рис. 4.2 и 4.3 представлены кривые роста штаммов-продуцентов и накопления rTOP. Данные по количеству биомассы и rTOP через 21 час после индукции приведены в таблице 4.1. Наибольший выход rTOP был получен при использовании в качестве продуцента штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)pLysS, добавлении IPTG в культуральную среду при $A_{600} = 1,0$ и последующем культивировании при 20°C в течение 20-24 часов.



Рис. 4.2. Влияние времени внесения IPTG и температуры культивирования на экспрессию rTOP в *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)pLysS. (A) Кривые роста биомассы и (**Б**) содержание rTOP.



Рис. 4.3. Влияние времени внесения IPTG и температуры культивирования на экспрессию rTOP в *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS. **(A)** Кривые роста биомассы и **(Б)** содержание rTOP.

Таблица 4.1.

Сравнение выходов рекомбинантной пероксидазы табака при различных условиях культивирования штаммов-продуцентов через 21 час после внесения индуктора.

Условия культивирования		<i>E. coli</i> BL21- CodonPlus(DE3)pLysS		E. coli Rosetta(DE3)pLysS	
		A ₆₀₀	rTOP, мг/л среды	A ₆₀₀	rTOP, мг/л среды
27°C	Индукция при A ₆₀₀ = 0,6	8,3	44,4	5,3	51,5
	Индукция при А ₆₀₀ = 1	7,5	82,4	6,1	70,8
20°C	Индукция при А ₆₀₀ = 0,6	7,3	68,0	6,0	55,6
	Индукция при A ₆₀₀ = 1	7,4	104,5	6,4	35,7

После выбора штамма-продуцента и условий его культивирования было изучено влияние добавления в питательную среду фосфатов и глицерина на выход rTOP (рис. 4.4, табл. 4.2). Из представленных данных видно, что внесение фосфатов и глицерина позволяет повысить выход биомассы примерно в 1,5 раза. При этом выход rTOP с 1 л культуральной среды увеличился в 4 раза. Таким образом, было показано, что использование модифицированной среды 2xYT (16 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л хлорида натрия, 1,5 г/л KH₂PO₄; 1 г/л Na₂HPO₄, 1 % глицерина) позволяет значительно повысить выход rTOP.

Таблица 4.2

Выходы биомассы и рекомбинантной пероксидазы табака через 10 часов после индукции экспрессии при культивировании штамма-продуцента *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)pLysS в питательной среде различного состава.

Состав питательной среды			rTOP, мг/л среды
	среда 2хҮТ	4,5	47,4
без глицерина	среда 2хҮТ; 0,625 г/л КН ₂ РО ₄ ; 0,375 г/л Na ₂ HPO ₄	5,9	82,7
	среда 2хҮТ; 1,5 г/л КН ₂ РО ₄ ; 1 г/л Na ₂ HPO ₄	6,4	160,8
	среда 2хҮТ	4,7	49,8
1% глицерина	среда 2хҮТ; 0,625 г/л КН ₂ РО ₄ ; 0,375 г/л Na ₂ HPO ₄	5,9	90,8
	среда 2хҮТ; 1,5 г/л КН ₂ РО ₄ ; 1 г/л Na ₂ HPO ₄	6,6	194,2



Рис. 4.4. Влияние добавления фосфатов и глицерина в питательную среду на экспрессию гТОР в *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)pLysS. (А) Кривые роста биомассы и (Б) количество гТОР при различном составе питательной среды: 1 – среда 2хYT; 2 - среда 2хYT, 1% глицерина; 3 - среда 2хYT, 0,625 г/л КН₂PO₄, 0,375 г/л Na₂HPO₄; 4 - среда 2хYT, 0,625 г/л КН₂PO₄, 0,375 г/л Na₂HPO₄; 4 - среда 2хYT, 1,5 г/л КН₂PO₄, 1 г/л Na₂HPO₄; 6 - среда 2хYT, 1,5 г/л КН₂PO₄, 1 г/л Na₂HPO₄, 1 г/л Na₂HPO₄

На следующем этапе была проведена оптимизация условий ренатурации rTOP из телец включения.

4.2. Оптимизация условий рефолдинга рекомбинантной пероксидазы табака дикого типа методом разведения

Ранее в нашей лаборатории была разработана методика для ренатурации rTOP из телец включения. Для этого был использован метод разведения, при котором предварительно отмытые тельца включения растворяют с помощью хаотропного агента (6 М мочевины), а затем при постоянном перемешивании добавляют в рефолдинг-среду. За основу были взяты условия проведения рефолдинга для рекомбинантной пероксидазы из корней хрена (HRP), также подобранные в нашей лаборатории. Небольшая их оптимизация позволила осуществить рефолдинг rTOP и получить активный фермент в достаточном количестве для изучения его свойств. Однако эффективность разработанной методики оставалась невысокой (не превышала 14%), что ограничивало возможность практического применения rTOP. Поэтому в данной работе была проведена дальнейшая оптимизация состава рефолдинг-среды и других параметров рефолдинга для повышения выхода активного фермента.

Для экспериментов по оптимизации условий рефолдинга rTOP биомассу отделяли от культуральной среды центрифугированием, далее клетки разрушали с помощью ультразвука, центрифугировали, а осадок телец включения многократно промывали, после чего солюбилизировали в 6 М мочевине с добавлением 1 мМ DTT (см. раздел 3.3.4). Для оценки чистоты полученного апо-фермента проводили аналитический SDS-электрофорез: доля апо-rTOP в отмытых тельцах включения составляла 80-85 % (рис. 4.5). Оптимизацию состава рефолдинг-среды проводили для небольших объёмов на основании базового протокола: солюбилизированный апо-фермента добавляли по каплям при перемешивании к 10 мл охлаждённой до 4 °C среды для рефолдинга (1,8 М мочевина, 5 мМ CaCl₂, 0,1 мМ DTT, 0,5 мМ GSSG, 5 % глицерин в 50 мМ Tris-HCl, pH 9,5). Через 24 часа инкубации при 4 °C в рефолдинг-среду вносили гемин до конечной концентрации 5 мкМ. По сравнению с ранее использованным протоколом была снижена концентрация белка (до 15-20 мкг/мл вместо 80-100 мкг/мл). В процессе оптимизации варьировали такие

- 78 -

параметры, как pH, концентрация мочевины, DTT, GSSG, белка, а также время добавления и концентрацию гемина.



Рис. 4.5. Электрофореграмма белков в денатурирующих условиях в 12,5% полиакриламидном геле. М – маркеры молекулярного веса (кДа); 1 – клетки *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)pLysS через 6 часов после индукции; 2 – отмытые тельца включения; 3 – очищенная пероксидаза табака.

Мониторинг ренатурации rTOP осуществляли путём измерения каталитической активности по отношению к ABTS. Эффективность рефолдинга rTOP оценивали по уровню каталитической активности в рефолдинг-среде после достижения максимального значения.

4.2.1. Влияние концентрации окисленного глутатиона и дитиотреитола на выход активной пероксидазы табака при рефолдинге

Для растительных пероксидаз III класса, к которым относится и TOP, характерно наличие четырёх внутримолекулярных дисульфидных связей. Их образование в процессе рефолдинга является одним из ключевых факторов, определяющих формирование и поддержание правильной конформации rTOP, что, в свою очередь, влияет как на активность фермента, так и на его стабильность. В то же время наличие восьми остатков Cys в rTOP повышает вероятность формирования межмолекулярных дисульфидных мостиков и агрегации белка, что ведёт к снижению выхода активной rTOP. Поэтому состав среды для рефолдинга должен способствовать образованию строго определённых дисульфидных связей. Это достигается внесением в рефолдинг-среду смеси восстанавливающих и окисляющих тиоловых реагентов, таких как GSSG и DTT, в оптимальном для каждого конкретного белка соотношении.

Для изучения влияния концентрации GSSG и DTT на выход активной гTOP рефолдинг проводился при различных соотношениях этих реагентов. Остальные условия рефолдинга соответствовали ранее описанным в статье [82] (1,8 M мочевина, 5 мM CaCl₂, 5 мкM гемин, 5 % глицерин в 50 мM Tris-HCl, pH 9,5), за исключением концентрации белка, которая была снижена со 100 до 15 мкг/мл, а также наличия предварительной 24-часовой инкубации при 4 °C перед внесением гемина в рефолдинг-среду (в диссертационной работе Полозникова А.А. было показано, что внесение гемина в рефолдинг-среду через сутки после апо-фермента позволяет повысить выход активной гTOP примерно на 30% [131]).

Концентрацию GSSG варьировали в диапазоне 0,3 - 0,7 мМ, а DTT – 0,05 - 0,4 мМ. Как видно из приведённых на рис. 4.6 данных, максимальный выход каталитической активности наблюдался при минимальной из использованных концентраций GSSG (0,3 мМ). При этой концентрации GSSG выход активного фермента практически не зависел от концентрации DTT. Поэтому для дальнейших экспериментов по оптимизации рефолдинга rTOP использовались концентрации GSSG и DTT, равные 0,3 и 0,05 мМ, соответственно.



Рис. 4.6. Влияние концентрации дитиотреитола (DTT) и окисленного глутатиона (GSSG) на выход активной rTOP в процессе рефолдинга.

Отличие оптимальных концентраций GSSG и DTT от полученных ранее в работе [82] объясняется, по-видимому, 6-кратным увеличением разведения солюбилизированного белка в среде для рефолдинга в данной работе по сравнению с предыдущим протоколом. Так как при более низкой концентрации белка вероятность образования межмолекулярных дисульфидных связей существенно снижается, для их восстановления уже не требуется высокая концентрация DTT.

4.2.2. Влияние рН на эффективность рефолдинга пероксидазы табака

Значение рН также влияет на образование дисульфидных связей, так как при щелочных значениях рН происходит формирование реакционноспособного тиолатаниона [243]. Согласно литературным данным, оптимальные значения рН для рефолдинга различных пероксидаз лежат в щелочной области: 8,0 (или 8,5) - для пероксидазы хрена [22,244], 8,0 - для марганец-пероксидазы из *Phanerochaete chrysosporium* [11] и для пероксидазы репы [112], 8,7 – для пероксидазы сои [245], 8,9 – для пероксидазы ячменя [113] и пероксидазы А2 из *Arabidopsis thaliana* [246], 9,2 – для пероксидазы N из *A. thaliana* [113], 9,5 – для лигнин-пероксидазы из *P. chrysosporium* [12] и для пероксидазы из *Pleurotus eryngii* [13]. Поэтому для оптимизации состава рефолдинг-среды был выбран диапазон рН 8,0-9,6 (значения при температуре проведения рефолдинга, равной 4 °C). Состав среды для рефолдинга был изменен в соответствие с подобранными на предыдущем этапе значениями концентраций GSSG и DTT: 0,3 и 0,05 мM, соответственно (см. раздел 4.2.1).



Рис. 4.7. Влияние рН на выход активной гТОР при рефолдинге методом разведения.

Как видно из рис. 4.7, наибольший выход по активности был получен при максимальном из исследованных значений рН, равном 9,6.

4.2.3. Влияние концентрации белка на эффективность рефолдинга пероксидазы табака

Концентрация белка является одним из ключевых факторов, определяющих эффективность рефолдинга, так как её снижение позволяет существенно уменьшить потери фермента в результате агрегации. Как правило, концентрация белка при проведении рефолдинга составляет 10 - 100 мкг/мл [118,248]. Как было отмечено выше, в данной работе для экспериментов по оптимизации рефолдинга rTOP концентрация белка изначально была снижена в 6 раз по сравнению с методикой, описанной в статье [82]. Для более подробного изучения влияния концентрации белка на ренатурацию rTOP, рефолдинг фермента был проведен при различных концентрациях белка (4-80 мкг/мл).

- 82 -



Рис. 4.8. Влияние концентрации белка в рефолдинг-среде на выход активной rTOP.

Максимальный выход активного фермента был достигнут при концентрации белка около 8 мкг/мл (рис. 4.8). При этом снижение конечной концентрации белка в рефолдинг-среде с 80 до 8 мкг/мл позволяет повысить выход активного фермента практически на порядок (в 9,4 раза).

4.2.4. Влияние концентрации мочевины на эффективность рефолдинга пероксидазы табака

Присутствие в среде для рефолдинга хаотропных агентов в небольших концентрациях позволяет повысить эффективность ренатурации за счет разрыва нековалентных связей между отдельными молекулами белка, уменьшая их агрегацию. Также хаотропные агенты позволяют поддерживать целевой белок в растворимой и подвижной форме. Этот подход широко применяется на практике и наиболее часто в рефолдинг-среду добавляют гуанидин хлорид и мочевину [116,117,244,249].

Оптимальная концентрация мочевины в рефолдинг-среде для различных пероксидаз варьируется в широких пределах (от 0,15 до 2 М) [22,115,116,247,250]. Ранее для rTOP наибольший выход активного фермента был получен при концентрации мочевины 1,8 М [82]. В рамках данной работы для изучения влияния

- 83 -

мочевины на эффективность рефолдинга rTOP был выбран диапазон концентраций 0 - 2,25 М.



Рис. 4.9. Влияние концентрации мочевины в рефолдинг-среде на выход активной rTOP.

Как видно из рис. 4.9, наибольший выход по активности был получен при минимальной концентрации мочевины: в этом случае мочевина не добавлялась в рефолдинг-среду, а вносилась только с раствором солюбилизированного белка. При этом конечная концентрация мочевины в среде для рефолдинга составляла около 60 мМ. Столь заметное изменение оптимальной концентрации мочевины по сравнению с [82], по-видимому, связано с тем, что для снижения агрегации rTOP присутствие мочевины в рефолдинг-среде уже не требуется из-за существенно более низкой концентрации апо-фермента.

4.2.5. Влияние концентрации хлорида кальция на выход активного фермента при рефолдинге пероксидазы табака

Структура растительных пероксидаз III класса помимо четырёх дисульфидных связей поддерживается также двумя кальций-связывающими доменами (дистальным и проксимальным). Критически важная роль ионов кальция в поддержании стабильности и активности фермента была показана для множества растительных пероксидаз [51,53,54,62,63,65,251,252]. Нами было изучено влияние

- 84 -

концентрации ионов кальция в рефолдинг-среде на эффективность *in vitro* ренатурации rTOP.



Рис. 4.10. Влияние концентрации CaCl₂ в рефолдинг-среде на эффективность реактивации rTOP.

Как видно из рис. 4.10, снижение концентрации $CaCl_2$ в среде для рефолдинга с 5 мМ до 0,5 мМ приводит к повышению выхода по каталитической активности в 2,3 раза. Так как рефолдинг – комплексный процесс, данный эффект может объясняться различными причинами. В частности, он может быть вызван неспецифическим связыванием ионов кальция, что может приводить к конформационным изменениям в области активного центра или субстратсвязывающего домена и падению активности фермента (более подробно влияние ионов кальция на свойства гТОР будет рассмотрено в разделе 4.4).

4.2.6. Влияние концентрации гемина и времени его добавления на эффективность рефолдинга пероксидазы табака

Каталитическая активность rTOP обусловлена наличием гема в её активном центре, поэтому в процессе ренатурации в среду необходимо вносить гемин. Для HRP было показано, что внесение гемина после предварительной инкубации апофермента в рефолдинг-среде позволяет увеличить выход активного фермента [61,244]. Ранее в нашей лаборатории также был проведён эксперимент по сравнению выхода активной гТОР при добавлении гемина в рефолдинг-среду одновременно с солюбилизированными тельцами включения или после 24-часовой инкубации при 4°C. Было показано, что во втором случае выход по активности выше примерно на 30% [131].

В данной работе была проверена возможность повышения выхода активной rTOP при дальнейшем увеличении продолжительности предварительной инкубации фермента в среде для рефолдинга перед внесением гемина. Также было изучено влияние концентрации гемина на эффективность рефолдинга rTOP.



Рис. 4.11. Влияние концентрации гемина и времени его добавления в рефолдинг-среду на эффективность реактивации rTOP.

Как видно из рис. 4.11, увеличение продолжительности инкубации ano-rTOP в среде для рефолдинга перед добавлением гемина с 24 до 96 ч не оказывает влияния на выход активного фермента. По-видимому, восстановление четвертичной структуры rTOP, как и в случае HRP, завершается менее, чем за 24 часа, а внесение гемина после предварительной инкубации апо-фермента неспецифического взаимодействия позволяет снизить вероятность его с полипептидной цепью.

Также было показано, что уменьшение концентрации гемина с 5 до 1 мкМ не отражается на эффективности ренатурации rTOP (при этом молярное соотношение апо-фермент - гемин составляет примерно 1 : 4,5).

После внесения гемина в среду для рефолдинга каталитическая активность достигает максимума примерно через 20 часов и может сохраняться без потерь в течение как минимум недели (рис. 4.12). Высокая стабильность rTOP в рефолдинг-среде упрощает проведение дальнейших манипуляций по его концентрированию и очистке.



Рис. 4.12. Рост каталитической активности в рефолдинг-среде после внесения гемина.

4.2.7. Влияние времени солюбилизации телец включения на эффективность рефолдинга пероксидазы табака

Для успешного проведения рефолдинга важно, чтобы солюбилизированный белок не подвергался окислению остатков цистеина и метионина. Поэтому время солюбилизации отмытых телец включения напрямую влияет на выход реактивации. Как видно из таблицы 4.4, внесение апо-фермента в рефолдинг-среду спустя 24 часа после солюбилизации телец включения в 6 М мочевине приводит практически к трехкратному падению выхода активного фермента. Поэтому при проведении рефолдинга необходимо минимизировать время солюбилизации, например, за счёт непрерывного перемешивания.

4.2.8. Оптимизированные условия проведения рефолдинга пероксидазы табака

На основании экспериментов по оптимизации условий рефолдинга rTOP можно сделать следующие заключения:

 необходимо использовать только свежеприготовленные тельца включения, время их солюбилизации должно быть минимальным (для этого необходимо проводить солюбилизацию при постоянном перемешивании);

 основной фактор, влияющий на выход активного фермента в процессе рефолдинга, - концентрация белка в рефолдинг-среде (её снижение со 100 мкг/мл до 8 мкг/мл привело к увеличению эффективности рефолдинга на порядок);

• внесение гемина после 24-часовой предварительной инкубации апо-rTOP в среде для рефолдинга позволяет повысить эффективность ренатурации на 30 %;

• низкая концентрация белка позволяет также значительно снизить концентрацию мочевины в рефолдинг-среде.

Оптимизированные условия *in vitro* ренатурации rTOP методом разведения перечислены ниже:

состав среды для рефолдинга rTOP: 0,5 мМ CaCl₂, 0,05 мМ DTT, 0,3 мМ
GSSG, 5 % глицерин в 50 мМ Tris-HCl буфере (pH 9,6 при 4 °C);

• свежие солюбилизированные в 6 М мочевине тельца включения вносятся по каплям при постоянном перемешивании в предварительно охлаждённую до 4 °C рефолдинг-среду, после чего смесь инкубируется при 4 °C в течение 24 часов;

• после инкубации в рефолдинг-среду вносится гемин до конечной концентрации 1 мкМ;

• через 10-12 часов после этого среда для рефолдинга может быть сконцентрирована для проведения очистки.

4.2.9. Рефолдинг пероксидазы табака с использованием гель-фильтрации

Использование хроматографических методов при проведении рефолдинга различных рекомбинантных белков в последнее время широко применяется на практике, так как они имеют ряд важных преимуществ. В первую очередь это

- 88 -

возможность снизить разведение ренатурированного белка, что сокращает расход реагентов и упрощает дальнейшую очистку [253,254]. В частности, было показано, что гель-фильтрация может эффективно применяться для рефолдинга различных белков [88,130,137–144,146,255–257]. Важным достоинством этого метода является сопутствующая очистка ренатурированного целевого белка от агрегатов и низкомолекулярных примесей [258]. Несмотря на то, что эффективность рефолдинга при использовании гель-фильтрации как правило не превышает эффективность рефолдинга при использовании метода разведения (или превышает незначительно [138,140]), во многих случаях этот метод позволяет проводить рефолдинг при существенно более высоких концентрациях белка [88,141,144,146,257].

Нами было проведено сравнение стандартного для рефолдинга rTOP метода разведения И метода рефолдинга с использованием гель-фильтрационной хроматографии (см. раздел 3.2.5). Был использован оптимизированный на предыдущем этапе (см. раздел 4.2.8) состав среды для рефолдинга. Однако так как при нанесении солюбилизированного белка на колонку может происходить его выпадение в осадок из-за резкого снижения концентрации хаотропного агента, в рефолдинг-среду было добавлено небольшое количество мочевины (0,1 М). Для рефолдинга rTOP контрольного методом разведения была использована рефолдинг-среды того же состава, что и для гель-фильтрации. Также идентичным было время добавления гемина.

При проведении рефолдинга на гель-фильтрационной колонке варьировали некоторые параметры процесса, такие как концентрация белка, наносимого на колонку, скорость потока и время добавления гемина.

На рис. 4.13 приведена одна из хроматограмм, полученных в ходе экспериментов по рефолдингу гТОР на гель-фильтрационной колонке. Первый пик соответствует практически чистой денатурированной гТОР, что было подтверждено проведением SDS-электрофореза полученных фракций (рис. 4.14). На рис. 4.13 также показаны максимальные значения ферментативной активности,

- 89 -

полученные для каждой фракции через 12 часов после добавления гемина. Для сравнения со стандартным протоколом для каждой хроматографии была использована суммарная активность всех фракций.



Рис. 4.13. Профиль элюции при рефолдинге rTOP на гель-фильтрационной колонке. Колонка 0,9*22 см с Toyopearl HW-55, уравновешенная рефолдинг-средой (0,1 M Tris-HCl буфер, pH 9,6, содержащий 0,1 M мочевину, 0,3 мM GSSG, 0,05 мM DTT, 5 мM CaCl₂ и 5% глицерин). Скорость потока – 0,2 мл/мин. Объём фракций – 0,4 мл. Гемин (5 мкМ) добавлен во фракции сразу после окончания хроматографии.



Рис. 4.14. Электрофореграмма фракций, собранных в ходе рефолдинга rTOP с использованием гель-фильтрации. М – маркеры молекулярного веса (кДа); 1 – пик 1 на рис. 4.13; 2 – пик 2 на рис. 4.13.

В таблице 4.3 приведено сравнение относительных выходов реактивации при использовании гель-фильтрации и метода разведения (за 100 % была принята эффективность рефолдинга при использовании метода разведения и добавлении гемина через сутки после внесения солюбилизированных телец включения в рефолдинг-среду).

Таблица 4.3

Сравнение относительных выходов реактивации гТОР методом разведения или с использованием гель-фильтрационной хроматографии.

	Относительный	
Условия проведения рефолдинга рекомбинантной пероксидазы табака	выход	
	реактивации, %	
<i>Метод разведения №1</i> . Объём солюбилизированного белка – 300 мкл;	68,2	
50-кратное разведение; конечная концентрация белка – 16 мкг/мл; гемин		
(5 мкМ) добавлен через 30 минут после внесения белка в рефолдинг-		
среду		
Метод разведения №2. Объём солюбилизированного белка – 300 мкл;	100	
50-кратное разведение; конечная концентрация белка – 16 мкг/мл; гемин		
(5 мкМ) добавлен через 24 часа после внесения белка в рефолдинг-среду		
Гель-фильтрация №1. Объём солюбилизированного белка – 300 мкл;		
начальная концентрация белка – 0,8 мг/мл; скорость потока – 0,4	8,6	
мл/мин; объём фракций – 0,4 мл; гемин (5 мкМ) добавлен в каждую		
фракцию сразу после завершения хроматографии.		
Гель-фильтрация №2. Объём солюбилизированного белка – 300 мкл;	20,9	
начальная концентрация белка – 0,2 мг/мл; скорость потока – 0,4		
мл/мин; объём фракций – 0,4 мл; гемин (5 мкМ) добавлен в каждую		
фракцию сразу после завершения хроматографии.		
Гель-фильтрация №3. Объём солюбилизированного белка – 300 мкл;		
начальная концентрация белка – 0,8 мг/мл; скорость потока – 0,2	14,1	
мл/мин; объём фракций – 0,4 мл; гемин (5 мкМ) добавлен в каждую		
фракцию сразу после завершения хроматографии.		
Гель-фильтрация №4. Объём солюбилизированного белка – 300 мкл;	34,9	
начальная концентрация белка – 0,8 мг/мл; скорость потока – 0,2		
мл/мин; объём фракций – 0,4 мл; гемин (5 мкМ) добавлен в каждую		
фракцию через 24 часа после завершения хроматографии.		

При скорости потока 0,4 мл/мин, начальной концентрации белка около 0,8 мг/мл и добавлении гемина сразу после завершения сбора фракций эффективность ренатурации составляла лишь около 9% по отношению к стандартному протоколу. Уменьшение концентрации белка, наносимого на колонку, в 4 раза привело к увеличению выхода активного фермента в 2,4 раза (с 9 до 21%). После снижения скорости потока до 0,2 мл/мин выход активного

фермента также несколько повысился (с 9 до 14%). Однако самое заметное влияние на эффективность ренатурации оказала предварительная инкубация собранных фракций при 4°C в течение 24 часов перед внесением гемина (увеличение эффективность рефолдинга в 2,5 раза: с 14 до 35%).

Таким образом, было показано, что в случае rTOP эффективность метода прямого разведения значительно выше, чем при проведении рефолдинга на гельфильтрационной колонке. Поэтому для дальнейших экспериментов фермент был наработан с использованием оптимизированного метода разведения (раздел 4.2.8).

4.3. Наработка и очистка рекомбинатной пероксидазы табака

Для определения эффективности каждой стадии процесса получения рекомбинантной пероксидазы табака, а также последующих экспериментов по получению конъюгатов rTOP с антителами и созданию биосенсоров была проведена наработка фермента с использованием оптимизированных условий рефолдинга (см. раздел 4.2.8). Биомассу (около 0,44 г), полученную из 200 мл культуральной среды, разрушали с помощью ультразвука. Выделенные и отмытые тельца включения солюбилизировали в 40 мл 6 М мочевины, содержащей 1 мМ DTT, в течение 1,5 часов при 4 °С и постоянном перемешивании на магнитной мешалке (см. раздел 3.2.4). После этого солюбилизированный апо-фермент вносили по каплям при постоянном перемешивании в 2,75 л предварительно охлаждённой до 4 °С рефолдинг-среды. Затем смесь инкубировали в течение 24 часов при 4 °C, после чего вносили гемин до конечной концентрации 1 мкМ и через определённые промежутки времени измеряли каталитическую активность в среде по отношению к ABTS. После завершения роста активности (примерно через 16 часов; CM. рис. 4.12) проводили концентрирование рефолдинг-среды с использованием ультрафильтрационной ячейки «Amicon» объемом 400 мл через мембрану ҮМ-10. Конечный объём концентрата составлял около 50 мл.

Далее полученный концентрированный раствор ренатурированной rTOP подвергался двухстадийной очистке с использованием гель-фильтрации. На первом

- 92 -

этапе раствор rTOP порциями по 10-12 мл очищали на колонке с Toyopearl HW-55 размером 5*50 см, уравновешенной 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5) (см. рис. 4.15).



Рис. 4.15. Хроматограмма первичной очистки rTOP на колонке 5*50 см с Toyopearl HW-55. Скорость потока 2 мл/мин. Объём фракций – 3 мл.

Для собранных фракций определяли спектр поглощения в диапазоне 220-660 нм и каталитическую активность по ABTS. Активные фракции с наибольшим значением RZ объединяли и концентрировали с использованием ультрафильтрационной ячейки «Amicon» объемом 50 мл через мембрану YM-10 до конечного объёма 7-8 мл. Вторичную очистку проводили на колонке размером 2,5*85 см с Toyopearl HW-55, уравновешенной тем же буфером (см. рис. 4.16). Снова собирали фракции с наибольшей каталитической активностью и значением RZ, объединяли и концентрировали.



Рис. 4.16. Хроматограмма вторичной очистки гТОР на колонке 2,5*85 см с Toyopearl HW-55. Скорость потока 1,5 мл/мин. Объём фракций – 3 мл.

В таблице 4.4 приведены данные по выходам на каждом этапе выделения и очистки гТОР. Для сравнения также указаны показатели рефолдинга и очистки гТОР, полученные ранее в работах [82] и [131].

Таблица 4.4

Стадия	Суммарный белок, мг	rTOP, мг	Выход реактивации*, %	Суммарная активность, Е	Удельная активность, Е/мг белка
Осадок клеток <i>E. coli</i>	260	104	_		
Отмытые тельца включения	109,9 60 [131] 38,7 [82]	93,5 56,4 [131] 33,5 [82]	_		
Реактиви- рованная rTOP		79 (30,5**) 1,8 [131] 4,6 [82]	84,5 3,2 [131] 13,7 [82]	324 700 7 200 [131] 5 060 [82]	2 950 120 [131] 150 [82]
Очищенный фермент		56,6 1,5 [131] 2,6 [82]	_	232 700 6 000 [131] 2 860 [82]	4 100 4 000 [131] 1 100 [82]

Выделение и очистка рекомбинантной пероксидазы табака дикого типа.

Данные приведены в расчёте на 1 л культуральной среды.

* Выход реактивации рассчитан как соотношение реактивированной rTOP к исходному количеству солюбилизированного апо-фермента.

**Для солюбилизированных телец включения, внесённых в рефолдинг-среду после 24часовой инкубации при 4 °C. Из приведённых данных видно, что оптимизация условий рефолдинга позволила повысить эффективность рефолдинга до 85 %. Такая эффективность рефолдинга является самой высокой из описанных в литературе для рекомбинантных пероксидаз и одной из самых высоких для рекомбинантных белков, экспрессируемых в *E. coli*, в целом (см. табл. 2.1).

В то же время из-за существенно большего объёма рефолдинг-среды и увеличившегося времени концентрирования, увеличились и потери по активности, поэтому конечный выход реактивированной rTOP после концентрирования и двух очисток составил около 57 мг на 1 литр культуральной среды.

Для синтеза конъюгатов с антителами по оптимизированной методике был также получен и очищенный препарат мутантной формы rTOP-F140Y.

4.4. Влияние ионов кальция на свойства рекомбинантной пероксидазы табака

Известно, что ионы кальция оказывают значительное влияние на активность и стабильность «растительных» пероксидаз II и III классов. Наиболее подробно этот вопрос изучен для модельного фермента III класса пероксидаз - HRP. Исследования показали, что ионы кальция играют критическую роль в поддержании нативной структуры фермента, а также седлообразной конформации гема, что важно для ферментативного катализа [51,53,251]. Данные о влиянии Ca²⁺ были получены и для пероксидазы арахиса [62,63], пероксидазы ячменя [252], пероксидазы сои [65], марганец-пероксидазы [67,68,71,73] и лигнин-пероксидазы [74,75,259]. Также ранее было показано, что концентрация ионов кальция влияет и на свойства нативной ТОР. Так, добавление хлорида кальция в реакционную смесь приводило к возрастанию активности нативной ТОР в реакции окисления вератрового спирта примерно в три раза, а также значительно повышало стабильность фермента при рН 1,8 [78]. В то же время, внесение хлорида кальция в анализируемую смесь снижало отклик на пероксид водорода биосенсора на основе нативной ТОР [79].

В процессе оптимизации рефолдинга rTOP в рамках данной работы было показано, что выход по активности падает с увеличением концентрации $CaCl_2$ в среде для рефолдинга (см. раздел 4.2.5). Так как данный эффект мог быть связан как с неправильным протеканием фолдинга rTOP при повышении концентрации Ca^{2+} , так и с влиянием ионов кальция на активность ренатурированного фермента, были проведены дальнейшие эксперименты по изучению влияния Ca^{2+} на свойства rTOP.

На первом этапе были изучены изменения в каталитических свойствах rTOP в зависимости от концентрации ионов кальция в среде. Проведённые измерения показали, что инкубация фермента с CaCl₂ в реакционную смесь приводит к ферментативной активности rTOP по отношению к изученным падению субстратам. Так, при концентрации CaCl₂, равной 20 мМ, активность фермента по отношению к фенолу падает примерно на 20 % (рис. 4.17), а по отношению к ABTS и гваяколу – примерно на 40 % (рис. 4.17 и 4.18). Это говорит о существенных различиях в механизмах окисления ABTS и гваякола по сравнению с фенолом под действием rTOP. Данное предположение согласуется с полученными нами данными по субстратной специфичности мутантных форм rTOP Q116W, F140Y, T151W, L157W и F140Y/T151W: активность rTOP после введения замен Q116W и T151W по отношению к фенолу возросла в 4 раза по сравнению с ферментом дикого типа, в то время как по отношению к ABTS и гваяколу осталась практически без изменений. Напротив, активность rTOP L157W, F140Y и F140Y/T151W по отношению к фенолу не изменилась, а по отношению к ABTS и гваяколу – упала в 1,5-2 раза [49].

На основании полученных данных можно сделать вывод, что снижение выхода по активности (по отношению к ABTS) при повышении концентрации CaCl₂ в рефолдинг-среде отчасти было связано со снижением каталитической активности ренатурированного фермента. Однако стоит отметить, что инкубация в присутствии 5 мМ CaCl₂ приводит к падению активности гTOP по отношению к ABTS примерно на 10%, в то время как выход по активности при проведении

- 96 -

рефолдинга в присутвии 5 мМ CaCl₂ был ниже примерно на 40% по сравнению с 0,5 мМ CaCl₂. То есть ионы кальция оказывают значительное влияние на протекание непосредственно фолдинга rTOP.



Рис. 4.17. Влияние концентрации CaCl₂ на активность rTOP по отношению к фенолу и гваяколу.

Стоит отметить, что добавление ионов кальция в реакционную смесь, хоть и приводит к падению ферментативной активности rTOP, не оказывает влияния на значение pH-оптимума как в реакции окисления вератрового спирта [78], так и в реакции окисления ABTS (рис. 4.19).



Рис. 4.18. Влияние концентрации CaCl₂ на активность rTOP по отношению к ABTS при различных значениях pH.



Рис. 4.19. Влияние концентрации CaCl₂ на pH-оптимум rTOP в реакции окисления ABTS.

Активность гТОР в хемилюминесцентной реакции окисления люминола также падает при повышении концентрации CaCl₂. Как показано на рис. 4.20, 15минутная инкубация фермента в присутствии 20 мМ CaCl₂ приводит к снижению интенсивности люминесценции примерно на 30 %. Таким образом, инкубация гТОР с ионами кальция приводит к снижению каталитической активности по отношению ко всем исследованным субстратам.



Рис. 4.20. Влияние концентрации $CaCl_2$ на активность rTOP по отношению к люминолу.

На втором этапе было изучено, как потеря Ca^{2+} влияет на каталитические свойства гТОР. Из литературных данных известно, что извлечение эндогенных ионов кальция приводит к потере или значительному снижению активности различных растительных и грибных пероксидаз, в том числе, HRP C [51,53,251]; пероксидазы арахиса [62,63], пероксидазы ячменя [252], пероксидазы сои [65], марганец-пероксидазы [67,68,71,73] и лигнин-пероксидазы [74,75,259]. Исследования показали, что Ca^{2+} играет критическую роль для поддержания нативной структуры пероксидаз II и III классов, а также для поддержания седлообразной конформации гема, что важно для протекания катализа [251].

Извлечь эндогенный Са²⁺ можно посредством добавления хелатирующего агента к раствору фермента. На рис. 4.21 приведена зависимость активности rTOP по отношению к «стандартному» субстрату – ABTS – от времени инкубации в присутствии различных концентраций EDTA. Из графика видно, что добавление EDTA ведёт к быстрому снижению специфической активности на 20-25%, после чего падение активности практически прекращается. По-видимому, это происходит вследствие потери дистального иона кальций, который связан слабее, чем проксимальный. Так, потеря дистального иона кальция в пероксидазах хрена и ячменя приводит к изменению положения каталитического остатка His относительно плоскости гема, что затрудняет протонирование и депротонирование субстратов в активном центре [251,252]. Однако так как окисление ABTS протекает по цепи переноса электронов, оно не требует участия дистального His. Вероятно, этим можно объяснить сравнительно небольшое снижение активности rTOP по отношению к этому субстрату после инкубации с EDTA.



Рис. 4.21. Влияние потери ионов кальция на активность rTOP по отношению к ABTS.

Была исследована и зависимость температурной стабильности гТОР от концентрации ионов кальция (1-20 мМ CaCl₂). На рис. 4.22 представлен график зависимости константы скорости термоинактивации при 52°C от концентрации CaCl₂. Видно, что внесение CaCl₂ оказывает стабилизирующее действие на фермент. При этом максимальный эффект достигается при 5 мМ CaCl₂. Ранее для различных пероксидаз II и III классов было показано, что при термоинактивации происходит диссоциация эндогенных ионов кальция, поддерживающих структуру фермента. Добавление экзогенного Ca²⁺, вероятно, позволяет компенсировать этот процесс. Также стабилизирующий эффект добавления CaCl₂ может быть объяснён компактизацией структуры гТОР вследствие неспецифического связывания ионов кальция.



Рис. 4.22. Влияние концентрации CaCl₂ на константу скорости термоинактивации гTOP при 52°C.

Таким образом, было показано, что ионы кальция влияют на активность и стабильность как нативной, так и рекомбинантной ТОР, а также на протекание фолдинга фермента.

4.5. Рекомбинантная пероксидаза табака как ферментная метка для иммуноанализа

В настоящее время всё большее применение на практике находит метод хемилюминесцентного иммуноанализа, основанного на измерении свечения, возникающего в результате протекания химической реакции. В большинстве иммуноферментных диагностических систем в качестве ферментной метки выступает HRP C, что обусловлено её достаточно высокой активностью по отношению к широкому спектру субстратов, стабильностью, небольшим размером (по сравнению, например, с щелочной фосфатазой), а также относительно низкой стоимостью и доступностью. Кроме того, хорошо изучены методы модификации HRP C. В основном, конъюгаты с HRP C определяют колориметрически, однако используется и определение по люминесценции. В качестве хемилюминесцентного субстрата для HRP C чаще всего используется люминол. Так как активность HRP C по отношению к люминолу невысока, для усиления интенсивности сигнала в

- 101 -

реакционную смесь добавляют т.н. «усилители хемилюминесценции». В качестве усилителей могут выступать различные ароматические амины, нафтолы, фенотиазины и фенолы (на практике в качестве усилителя часто выступает *n*йодфенол).

В отличие от HRP C, ТОР проявляет крайне высокую активность по отношению к люминолу даже в отсутствии усилителей хемилюминесценции [50,131], что делает перспективным её использование в качестве ферментной метки для иммуноанализа.

4.5.1. Получение конъюгатов рекомбинантной пероксидазы табака с антителами

Для получения конъюгатов HRP C с антителами обычно используют метод периодатного окисления. Однако так как гТОР не гликозилирована, нами был выбран другой способ модификации фермента – по аминогруппам. На рис. 4.23 приведена трёхмерная структура гТОР, на которой отмечено положение остатков лизина. Все восемь остатков Lys (положения 35, 64, 82, 111, 122, 153, 180 и 299) находятся на противоположной от входа в активный центр (на рисунке показан стрелкой) стороне молекулы, что снижает вероятность потери активности при химической модификации в результате возникновения стерических затруднений для молекул субстрата.



Рис. 4.23. Положение остатков лизина в молекуле пероксидазы табака. Стрелкой показан вход в активный центр фермента.

Для получения конъюгатов с антителами нами были использованы концентрированные растворы очищенных гТОР и гТОР-F140Y. Последний фермент был выбран из-за более высокой стабильности по отношению к инактивации пероксидом водорода и, как следствие, более стабильным сигналом в реакции окисления люминола [49].

Так как в качестве модельной тест-системы нами был выбран набор для определения содержания IgG мыши, для конъюгации были использованы антитела козы против иммуноглобулинов мыши. Схема синтеза конъюгатов rTOP-IgG и rTOP-F140Y-IgG приведена на рис. 4.24. На первом этапе rTOP (или rTOP-F140Y) активировали с помощью сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-

циклогексан-1-карбоксилата (sulfo-SMCC) и очищали от избытка реагента (см. раздел 3.2.13). Затем на поверхность антител вводили сульфгидрильные группы, для чего первичные аминогруппы модифицировали N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетатом (SATA). После снятия защитной группы (деацетилирования) антитела также очищали от избытка реагента и смешивали с активированной гTOP (или rTOP-F140Y), после чего инкубировали в течение ночи при 4 °C. При этом происходило образование тиоэфирной связи между ферментом и антителом. Полученные конъюгаты rTOP-IgG и rTOP-F140Y-IgG использовали далее для проведения иммуноанализа (раздел 4.5.3).



Рис. 4.24. Схема синтеза конъюгатов рекомбинантной пероксидазы табака с антителами.

Так как при химической модификации фермента может происходить изменение его свойств, в том числе снижение каталитической активности, нами было изучено влияние модификации аминогрупп rTOP с использованием sulfo-SMCC на активность фермента в хемилюминесцентной реакции окисления люминола.

4.5.2. Влияние модификации пероксидазы табака с использованием sulfo-SMCC на активность по отношению к люминолу

Чтобы определить, приводит ли модификация аминогрупп rTOP к потере каталитической активности, был проведён следующий эксперимент: после добавления к ферменту раствора sulfo-SMCC смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. В течение этого времени через определённые промежутки отбирали аликвоты и переносили в пробирки с 50-кратным избытком бычьего сывороточного альбумина (BSA), чтобы остановить модификацию rTOP. После этого измеряли активность rTOP по отношению к люминолу. Также контрольных образцах: 1) BSA (фоновая измеряли активность В трёх люминесценция); 2) rTOP без добавления sulfo-SMCC; 3) BSA и rTOP без sulfo-SMCC (исключение влияния BSA на добавления люминесценцию). Результаты эксперимента представлены на рис. 4.25.



Рис. 4.25. Влияние химической модификации rTOP с использованием sulfo-SMCC на каталитическую активность фермента по отношению к люминолу.

Как видно из приведённых данных, в процессе модификации rTOP с использованием sulfo-SMCC не происходит снижения активности фермента по отношению к люминолу.

4.5.3. Иммуноферментный анализ с использованием конъюгатов рекомбинантной пероксидазы табака с антителами

Полученные конъюгаты rTOP-IgG и rTOP-F140Y-IgG использовали для проведения иммуноанализа. Детекцию сигнала осуществляли двумя методами: колориметрическим и люминометрически. Для сравнения использовали конъюгат HRP-IgG.

За основу был взят коммерческий набор для определения содержания иммуноглобулинов мыши FastELISA фирмы «RD-Biotech» (Франция). Анализ содержания иммуноглобулинов мыши с колориметрической детекцией проводили в соответствии с инструкцией производителя, схема анализа приведена на рис. 4.26. В лунки прозрачного полистиролового планшета с преадсорбированными антимышиными антителами вносили по 20 мкл стандартных образцов (20 -1900 нг/мл мышиных IgG). Далее вносили по 100 мкл конъюгата поликлональных антимышиных антител с HRP, входящего в набор, или синтезированных конъюгатов rTOP-IgG и rTOP-F140Y-IgG. После 15-минутной инкубации при комнатной температуре планшет отмывали 3 раза 0,05% раствором Tween 20. Затем в лунки вносили по 100 мкл субстратной смеси (ТМВ и H₂O₂). После 10-15 минут инкубации при комнатной температуре добавляли по 100 мкл стоп-раствора и измеряли поглощение на 450 и 620 нм. Для каждого из конъюгатов измерения проводили в трёх повторах. На основании усреднённых данных по разнице поглощений при 450 и 620 нм (А₄₅₀-А₆₂₀) строили калибровочные кривые (см. рис. 4.27).



Рис. 4.26. Схема проведения иммуноанализа для определения содержания IgG мыши с колориметрической детекцией.



Рис. 4.27. Калибровочные кривые для определения содержания IgG мыши методом «сэндвич»-иммуноанализа с колориметрической детекцией, полученные при использовании конъюгатов антител козы против мышиных антител с пероксидазой хрена (HRP-IgG) и рекомбинантной пероксидазой табака (дикого типа – rTOP-IgG и мутантной формы Phe140Tyr – rTOP-F140Y-IgG).



Рис. 4.28. Начальный участок калибровочных кривых для определения содержания IgG мыши методом «сэндвич»-иммуноанализа с колориметрической детекцией, полученные при использовании конъюгатов антител козы против мышиных антител с пероксидазой хрена (HRP-IgG) и рекомбинантной пероксидазой табака (дикого типа – rTOP-IgG и мутантной формы Phe140Tyr – rTOP-F140Y-IgG).

Как приведённых данных, использование конъюгатов видно ИЗ С пероксидазой табака приводит к увеличению уровня детектируемого сигнала в 3 и 2 раза в случае фермента дикого типа (rTOP) или его мутантной формы (rTOP-F140Y), соответственно. Кроме того, конъюгаты rTOP-IgG и rTOP-F140Y-IgG обеспечивают В 3 раза более высокую чувствительность определения концентрации IgG мыши в области высоких концентраций (> 600 нг/мл) аналита по сравнению с HRP-IgG, а в случае rTOP-IgG – и при концентрации IgG мыши < 200 нг/мл (в 2 раза) (рис. 4.28).

Аналогично был проведён иммуноанализ для определения содержания IgG мыши с люминометрической детекцией (схема анализа приведена на рис. 4.29). В лунки белого непрозрачного полистиролового планшета с преадсорбированными антимышиными антителами вносили по 20 мкл стандартных образцов (20-1900 нг/мл IgG мыши). Далее вносили по 100 мкл конъюгата HRP-IgG или синтезированных конъюгатов rTOP-IgG и rTOP-F140Y-IgG. После 15-минутной инкубации при комнатной температуре планшет отмывали 3 раза 0,05 % раствором Tween 20. Затем в лунки вносили субстратную смесь. Для конъюгатов с rTOP и rTOP-F140Y: по 175 мкл 0,1 M Tris-HCl буфера (pH 8,3) и 25 мкл 10 мM раствора люминола. Для конъюгата HRP-IgG: по 150 мкл 0,1 M Tris-HCl буфера (pH 8,5), 25 мкл 10 мM раствора люминола и 25 мкл 10 мM раствора *n*-йодфенола. Реакцию инициировали внесением 50 мкл 10 мM H₂O₂, после чего измеряли интенсивность люминесценции в трёх повторах. На основании усреднённых данных по интенсивности люминесценции строили калибровочные кривые (рис. 4.33-35).



Рис. 4.29. Схема проведения иммуноанализа для определения содержания IgG мыши с люминометрической детекцией.


Рис. 4.30. Кинетические кривые изменения интенсивности люминесценции, полученные при определении различных концентраций IgG мыши (20-1900 нг/мл) методом хемилюминесцентного иммуноанализа с использованием конъюгата HRP-IgG.



Рис. 4.31. Кинетические кривые изменения интенсивности люминесценции, полученные при определении различных концентраций IgG мыши (20-1900 нг/мл) методом хемилюминесцентного иммуноанализа с использованием конъюгата TOP-IgG.



Рис. 4.32. Кинетические кривые изменения интенсивности люминесценции, полученные при определении различных концентраций IgG мыши (20-1900 нг/мл) методом хемилюминесцентного иммуноанализа с использованием конъюгата TOP140-IgG.

Как видно из рис. 4.30-32, интенсивность люминесценции при проведении CLIA без добавления усилителей хемилюминесценции в случае использования конъюгата rTOP-IgG на два порядка выше (в 110 раз), а при использовании rTOP-F140Y-IgG – в 20 раз выше по сравнению с HRP-IgG (при добавлении усилителей). При этом сигнал в случае rTOP-IgG затухает быстрее по сравнению с HRP-IgG и rTOP-F140Y-IgG. Более наглядно это видно из графиков, представленных на рис. 4.34 и 4.35. Видно, что даже через 16 минут после начала реакции калибровочная кривая в случае rTOP-F140Y сохраняет наклон практически без изменений.



Рис. 4.33. Градуировочные кривые для определения концентрации IgG мыши (20-1900 нг/мл) методом хемилюминесцентного иммуноанализа с использованием конъюгата HRP-IgG через определённые промежутки времени после начала реакции.



Рис. 4.34. Градуировочные кривые для определения концентрации IgG мыши (20-1900 нг/мл) методом хемилюминесцентного иммуноанализа с использованием конъюгата rTOP-IgG через определённые промежутки времени после начала реакции.



Рис. 4.35. Градуировочные кривые для определения концентрации IgG мыши (20-1900 нг/мл) методом хемилюминесцентного иммуноанализа с использованием конъюгата rTOP-F140Y-IgG через определённые промежутки времени после начала реакции.

Для сравнения калибровочных кривых были использованы значения интегральной люминесценции за первые 15 мин после начала реакции (см. рис. 4.36).



Рис. 4.36. Градуировочные кривые для определения концентрации IgG мыши (20-1900 нг/мл) методом хемилюминесцентного иммуноанализа с использованием конъюгатов rTOP-IgG, rTOP-F140Y-IgG и HRP-IgG (для построения был использован интеграл интенсивности люминесценции за 15 мин).

Наибольшее соотношение сигнал-шум было получено в случае конъюгата rTOP-IgG, в то время как для rTOP-F140Y, несмотря на большую интенсивность сигнала, соотношение сигнал-шум было таким же, как и при использовании HRP-IgG. Использование пероксидазы табака в качестве ферментной метки также обеспечивает лучшую чувствительность определения аналита: в области низких концентраций IgG мыши чувствительность анализа в случае rTOP-IgG и rTOP-F140Y-IgG по сравнению с HRP-IgG была выше в 49 и 11 раз, соответственно; в области высоких концентраций – в 54 и 23 раза. Высокая чувствительность анализа в области избежать предварительного разведения образцов перед проведением анализа.

Таким образом, пероксидаза табака в качестве ферментной метки является перспективной альтернативой для пероксидазы из корней хрена.

4.6. Влияние метода иммобилизации на электрокаталитическую активность рекомбинантной пероксидазы табака

В предыдущие годы был опубликован ряд совместных работ, посвящённых изучению электрокаталитических свойств нативной и рекомбинантной ТОР [79,225–229]. Были определены параметры прямого переноса электронов при иммобилизации фермента как на графитовом, так и на золотом электроде. Однако для иммобилизации ТОР был использован метод физической адсорбции, который, как известно, может приводить к существенным конформационным изменениям в структуре белка и его денатурации [230–233]. Поэтому в данной работе, выполненной совместно с лабораторией Rafael Andreu (факультет физической химии Севильского университета, Испания), было изучено влияние способа иммобилизации на свойства rTOP и характеристики безреагентных биосенсоров на её основе.

Фермент иммобилизовали на поверхности электрода тремя различными методами: 1) с помощью физической адсорбции; 2) с использованием стандартного карбодиимидного метода, который предусматривает активацию поверхности электрода, его отмывку, нанесение раствора фермента и финальную отмывку

- 113 -

электрода (рис. 4.37); 3) с использованием модифицированного метода химической иммобилизации, в котором была исключена промежуточная стадия отмывки электрода и фермент наносился одновременно с EDAC и sulfo-NHS (см. раздел 3.2.16).



Рис. 4.37. Схема химической иммобилизации rTOP с использованием карбодиимидного метода.

Вначале полученных биосенсоров были лля проведены вольтамперометрические измерения в отсутствии пероксида водорода. На рис. 4.38 представлены циклические вольтамперограммы, полученные при различных скоростях развёртки потенциала для rTOP, иммобилизованной путём физической адсорбции на графитовом электроде. Видно, что циклических на вольтамперограммах присутствуют две волны, одна из которых (в районе 200 мВ по отношению к стандартному водородному электроду – СВЭ) присутствует и на вольтамперограмме, полученной для электрода без иммобилизованного фермента. Наличие этого перехода, по-видимому, обусловлено присутствием хиноновых групп на поверхности графитового электрода. Вторая волна фиксировалась только в присутствии гТОР, то есть соответствует переходу Fe^{3+}/Fe^{2+} . Потенциал полуволны $E_{1/2}$ для этого перехода составлял около -80 мВ по отношению к СВЭ. При этом даже при больших скоростях развёртки (100 В/с) расстояние между анодным и катодным пиками было невелико ($\Delta E_p = 160$ мВ), что говорит о высокой скорости электронного обмена.



Рис. 4.38. Циклические вольтамперограммы, полученные для гТОР, адсорбированной на поверхности графитового электрода, при различных скоростях развёртки: 0,1 (штрихпунктирная линия); 1; 2; 5 (пунктирная линия) и 10 В/с. Измерения проводились при 0 °C в 20 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7). Серая пунктирная линия показывает вольтамперограмму, полученную при скорости развёртки 10 В/с, для электрода без иммобилизованного фермента. Значения потенциала указаны по отношению к СВЭ.

Близкие характеристики электродного процесса были получены и при использовании стандартного карбодиимидного метода для химической иммобилизации фермента на электроде (включающего предварительную поверхности электрода с последующей отмывкой от избытка активацию

сшивающих агентов): $E_{1/2}$ для Fe³⁺/Fe²⁺ – около -72 мВ по отношению к CBЭ (рис. 4.39) и $\Delta E_p = 195$ мВ (при скорости развёртки 100 В/с).

Однако к самым заметным изменениях В форме циклических вольтамперограмм привело применение модифицированного протокола химической иммобилизации rTOP (с одновременным нанесением фермента и сшивающих агентов на поверхность электрода): значительно увеличилась высота анодного и катодного пиков, а также уменьшилось расстояние между ними $(\Delta E_p = 135 \text{ мВ}$ при скорости развёртки 100 В/с) (рис. 4.40).



Рис. 4.39. Циклические вольтамперограммы, полученные для гТОР, химически иммобилизованной на поверхности графитового электрода с использованием протокола с промежуточной отмывкой от EDAC и sulfo-NHS, при различных скоростях развёртки: 0,1 (штрихпунктирная линия); 1; 2; 5 (пунктирная линия) и 10 В/с. Измерения проводились при 0°С в 20 мМ Na-фосфатном буфере (рН 7). Серая пунктирная линия соответствует вольтамперограмме, полученной при скорости развёртки 10 В/с, для электрода без иммобилизованного фермента. Значения потенциала указаны по отношению к СВЭ.



Рис. 4.40. Циклические вольтамперограммы, полученные для гТОР, химически иммобилизованной на поверхности графитового электрода с использованием протокола без промежуточной отмывки от EDAC и sulfo-NHS, при различных скоростях развёртки: 0,1 (штрихпунктирная линия); 1; 2; 5 (пунктирная линия) и 10 В/с. Измерения проводились при 0°С в 20 мМ Na-фосфатном буфере (рН 7). Серая пунктирная линия соответствует вольтамперограмме, полученной при скорости развёртки 10 В/с, для электрода без иммобилизованного фермента. Значения потенциала указаны по отношению к СВЭ.

Для определения констант скорости прямого переноса электронов k_s были построены зависимости разрешения анодного и катодного пиков от скорости развёртки потенциала в полулогарифмических координатах для всех трёх вариантов иммобилизации гТОР на электроде (рис. 4.41). Значения k_s были определены на основании полученных зависимостей с использованием подхода, описанного Laviron [260]. Коэффициент электронного переноса α при этом был принят равным 0,5. Результаты определения приведены в табл. 4.5.



Рис. 4.41. Зависимость расстояния между анодным и катодным пиками перехода Fe³⁺/Fe²⁺ от логарифма скорости развёртки. Измерения проводились при 0°C в 20 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7). 1 – гемин, иммобилизованный путём физической адсорбции; 2 – гTOP, иммобилизованная с использованием карбодиимидного метода с промежуточной отмывкой электрода от EDAC и sulfo-NHS; 3 – гTOP, иммобилизованная путём физической адсорбции; 4 - гTOP, иммобилизованная с использованием карбодиимидного метода без промежуточной отмывки от EDAC и sulfo-NHS.

Полученные данные говорят о некотором увеличении скорости прямого переноса электронов при использовании модифицированного протокола химической иммобилизации гTOP карбодиимидным методом (без промежуточной отмывки электрода от EDAC и sulfo-NHS). Тем не менее, значения k_s во всех трёх случаях близки.

Таблица 4.5

Метод иммобилизации	Е _{1/2} (по отн. к СВЭ), мВ	Полуширина пика, мВ	k_S , c ⁻¹
Физическая адсорбция	$-(80 \pm 8)$	136 ± 16	300 ± 30
Химическая иммобилизация (с промежуточной отмывкой электрода от EDAC и sulfo-NHS)	- (72 ± 12)	163 ± 20	280 ± 30
Химическая иммобилизация (с одновременным нанесением фермента, EDAC и sulfo-NHS)	$-(100 \pm 10)$	213 ± 15	350 ± 30

Электрохимические характеристики биосенсоров, полученных с использованием разных методов иммобилизации rTOP на поверхности графитового электрода

На следующем этапе были изучены электрокаталитические свойства rTOP. Ha рис. 4.42-44 иммобилизованной приведены циклические вольтамперограммы, записанные для трёх исследуемых биосенсоров при внесении различных концентраций H₂O₂. Видно, что биосенсор, полученный путём физической адсорбции rTOP на поверхности электрода, имеет самый низкий отклик на H₂O₂. Применение химической иммобилизации rTOP привело к значительному увеличению величины регистрируемого тока. При этом форма циклических вольтамперограмм в присутствии H₂O₂ существенно различалась для стандартного и модифицированного карбодиимидного метода химической иммобилизации фермента на электроде: в первом случае вольтамперограммы имели S-образную форму, что говорит о кинетических ограничениях процесса, а во втором вольтамперограммы имели больший наклон и чётко выраженный анодный пик, что говорит о лимитирующей стадии диффузии H₂O₂ к поверхности электрода. Данный эффект может быть связан с тем, что одновременная инкубация rTOP с EDAC и sulfo-NHS позволяет достичь большей поверхностной концентрацией активного фермента.

Для исследуемых биосенсоров были также построены кривые зависимости тока от концентрации H_2O_2 (рис. 4.45). Если при физической адсорбции фермента на поверхности электрода ток был существенно ниже и достигал максимального значения уже при концентрации H_2O_2 около 0,1 мМ, то при химической иммобилизации rTOP наблюдался существенно более высокий отклик на H_2O_2 и широкий линейный диапазон на калибровочной кривой. При этом стабильность фермента к инактивации H_2O_2 заметно различалась для стандартного и модифицированного карбодиимидного метода: в первом случае ток достигал максимального значения примерно при 0,8 мМ H_2O_2 , во втором – при 1,8 мМ H_2O_2 .

Сравнение основных параметров безреагентных биосенсоров на основе rTOP, полученных с использованием двух методов химической иммобилизации, приведены в табл. 4.6. Видно, что одновременное нанесение фермента и

сшивающих агентов позволило получить биосенсор с большей чувствительностью определения H₂O₂, а также более широким линейным диапазоном.



Рис. 4.42. Циклические вольтамперограммы, полученные для гТОР, адсорбированной на поверхности графитового электрода, при скорости развёртки 0,01 В/с. Измерения проводились при 0°С в 20 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7). Значения потенциала указаны по отношению к СВЭ.



Рис. 4.43. Циклические вольтамперограммы, полученные для rTOP, иммобилизованной на поверхности графитового электрода с использованием карбодиимидного метода с промежуточной отмывкой от EDAC и sulfo-NHS, при скорости развёртки 0,01 В/с. Измерения проводились при 0°C в 20 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7). Значения потенциала указаны по отношению к CBЭ.



Рис. 4.44. Циклические вольтамперограммы, полученные для гТОР, иммобилизованной на поверхности графитового электрода с использованием карбодиимидного метода без промежуточной отмывки от EDAC и sulfo-NHS, при скорости развёртки 0,01 В/с. Измерения проводились при 0°C в 20 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7). Значения потенциала указаны по отношению к CBЭ.



Рис. 4.45. Электрокаталитический ток при внесении 0,56 мМ H₂O₂ и постоянном приложенном потенциале 0,3 В для трёх различных методов иммобилизации гТОР на поверхности электрода: 1 – физическая адсорбция; 2 – химическая иммобилизация с использованием карбодиимидного метода с промежуточной отмывкой от EDAC и sulfo-NHS; 3 – химическая иммобилизация с использованием карбодиимидного метода без промежуточной отмывки от EDAC и sulfo-NHS. Измерения проводились в 20 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7) при 0°С.

Таблица 4.6

Параметры	безреагентных	биосенсоров,	полученных	c c	использовани	іем	химической
иммобилизации гТОР на поверхности графитового электрода							

Метод иммобилизации	Предел обнаружения H ₂ O ₂ , мкМ	Чувствитель- ность, мА/(М·см ²)	Линейный диапазон, мкМ
Химическая иммобилизация (с промежуточной отмывкой электрода от сшивающих агентов)	3 ± 0,2	55 ± 5	10 - 700
Химическая иммобилизация (с одновременным нанесением фермента и сшивающих агентов на электрод)	2 ± 0,2	80 ± 4	10 - 900

Так как при физической адсорбции rTOP на электроде и её химической иммобилизации константы скорости прямого переноса электронов k_s имели сходные значения (табл. 4.5), низкий отклик биосенсора на основе rTOP на H₂O₂ в случае физической адсорбции говорит, по-видимому, 0 значительных конформационных изменениях в структуре активного центра фермента и/или его недоступности для молекул субстрата. В то же время иммобилизация за счёт образования ковалентных связей между поверхностью графитового электрода и амино-группами rTOP должна обеспечивать свободный доступ в активный центр фермента, так как остатки Lys расположены на противоположной от него стороне (рис. 4.23). Причиной же более высокой операционной стабильности фермента, достигнутой при одновременной инкубации rTOP, EDAC и sulfo-NHS на поверхности электрода, может являться образование внутри- и межмолекулярных ковалентных сшивок. Но так как практически все остатки Lys в rTOP (кроме Lys111) расположены рядом с остатками Glu и Asp, более вероятным представляется формирование внутримолекулярных сшивок, чем олигомеризация фермента. В результате этого структура rTOP может приобретать дополнительную «жёсткость», что снижает вероятность денатурации фермента при иммобилизации.

Для проверки предположения о роли ковалентных сшивок, образующихся при совместной инкубации фермента с EDAC и sulfo-NHS, вначале было изучено влияние продолжительности инкубации на свойства безреагентного биосенсора.

Для этого были построены зависимости тока от концентрации H_2O_2 при постоянном приложенном потенциале 0,3 В для биосенсоров, полученных при продолжительности инкубации гТОР с EDAC и sulfo-NHS, равной 30 мин, 8, 20 и 48 ч. Сравнение калибровочных кривых показало, что оптимальной является инкубация гТОР с EDAC и sulfo-NHS в течение 20 ч, так как при меньшем времени инкубации отклик биосенсора ниже во всём исследованном диапазоне концентраций H_2O_2 , а при увеличении продолжительности иммобилизации происходит снижение регистрируемого тока в области высоких концентраций H_2O_2 (рис. 4.46). Аналогично продолжительность совместной инкубации гТОР, EDAC и sulfo-NHS на поверхности электрода влияет и на стабильность полученных биосенсоров при хранении (см. рис. 4.47).



Рис. 4.46. Зависимость электрокаталитического тока от концентрации H₂O₂ при постоянном приложенном потенциале 0,3 В при различной продолжительности инкубации rTOP с EDAC и sulfo-NHS на поверхности электрода. Измерения проводились в 20 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7) при 0°C.



Рис. 4.47. Снижение отклика на H₂O₂ безреагентных биосенсоров на основе rTOP, химически иммобилизованной с использованием карбодиимидного метода, при хранении. Биосенсоры были получены путём совместной инкубации rTOP с EDAC и sulfo-NHS на поверхности электрода при различной продолжительности инкубации (2 и 20 часов).

Полученные данные говорят о наличие двух разнонаправленных процессов, влияющих на характеристики биосенсора, полученного с использованием модифицированного карбодиимидного метода. Поэтому далее было изучено влияние времени совместной инкубации rTOP, EDAC и sulfo-NHS на поверхности электрода на значения поверхностной концентрации электроактивных групп Ггем (рис. 4.48) и константы скорости прямого переноса электронов k_s (рис. 4.49). Закономерно, что увеличение продолжительности инкубации фермента со сшивающими агентами приводит к росту его поверхностной концентрации (Ггем увеличилась с 70 пмоль/см² при 10-часовой инкубации до 130 пмоль/см² при 50часовой инкубации). Но в то же время значение k_S начинает сильно снижаться уже примерно через сутки после нанесения фермента на поверхность электрода (с 350 с⁻¹ при 10-часовой инкубации до 150 с⁻¹ при 50-часовой инкубации). Повидимому, формирование слишком большого числа внутри- и межмолекулярных сшивок приводит к серьезным конформационным изменениям в структуре фермента, нивелирующим первоначальный стабилизирующий эффект. Это

обуславливает снижение отклика биосенсора при увеличении времени иммобилизации rTOP до 48 ч.



Рис. 4.48. Зависимость поверхностной концентрации групп гема от продолжительности совместной инкубации rTOP с EDAC и sulfo-NHS на поверхности электрода.



Рис. 4.49. Зависимость константы скорости переноса электронов от продолжительности совместной инкубации rTOP с EDAC и sulfo-NHS на поверхности электрода.

При инкубации rTOP на поверхности электрода совместно со сшивающими агентами происходит одновременное образование ковалентных связей внутри и между молекулами фермента, а также между молекулами фермента и поверхностью электрода. Соответственно, и на улучшение характеристик биосенсора наибольшее влияние оказывает либо стабилизация фермента, либо его более правильная ориентация на поверхности по сравнению с физической адсорбцией. Поэтому был проведён эксперимент, при котором фермент предварительно в течение 18 ч инкубировали в растворе, содержащем EDAC и sulfo-NHS в тех же концентрациях, что и в случае химической иммобилизации без промежуточной отмывки от сшивающих агентов, а затем наносили на поверхность электрода и инкубировали ещё в течение 2 ч. На рис. 4.50 приведены зависимости отклика данного биосенсора в сравнении с биосенсорами, полученными путём химической иммобилизации rTOP при последовательном или одновременном нанесении фермента и сшивающих агентов.



Рис. 4.50. Зависимость силы тока от концентрации пероксида водорода для безреагентных биосенсоров на основе гТОР. Фермент был иммобилизован на поверхности электрода: 1 – путём совместной инкубации в течение 20 ч с EDAC и sulfo-NHS; 2 – после предварительной 18-часовой инкубации с EDAC и sulfo-NHS с последующей 2-часовой инкубацией на поверхности электрода; 3 – с использованием стандартного карбодиимидного метода, включающего предварительную 2-часовую активацию поверхности электрода EDAC и sulfo-NHS с последующей отмывкой от избытка реагентов и нанесением фермента. Измерения проводились в 20 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7).

Видно, что отклик биосенсора в случае предварительно модифицированного фермента превосходит отклик биосенсора, полученного при нанесении немодифицированной rTOP на активированную поверхность электрода, и практически совпадает с откликом биосенсора, полученного при одновременной инкубации rTOP с EDAC и sulfo-NHS в течение 20 ч, несмотря на значительно меньшее время инкубации фермента на поверхности электрода (2 ч) (ср. рис. 4.46). Полученные данные подтверждают предположение о ключевой роли формирования меж- и внутримолекулярный сшивок в стабилизации rTOP при её химической иммобилизации на поверхности электрода.

На завершающем этапе было изучено влияние температуры на свойства безреагентного биосенсора, полученного с помощью карбодиимидного метода без промежуточной отмывки электрода от сшивающих агентов. Показано, что снижение температуры позволяет несколько повысить стабильность иммобилизованной гТОР к инактивации H₂O₂ (рис. 4.51), однако чувствительность определения H₂O₂ при концентрациях, меньших 600 мкМ, при этом ниже.



Рис. 4.51. Зависимость силы тока от концентрации пероксида водорода при различной температуре для биосенсора на основе гТОР. Фермент был иммобилизован на поверхности электрода с использованием карбодиимидного метода без промежуточной отмывки от EDAC и sulfo-NHS. Измерения проводились в 20 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7) при постоянном приложенном потенциале 0,3 В по отношению к СВЭ.

Так как большее практическое значение имеет определение низких концентраций H₂O₂, была определена оптимальная температура для проведения измерений концентрации H₂O₂ с использованием данного биосенсора в области

линейного диапазона (0-560 мкМ). Было показано, что оптимальным является проведение измерений при комнатной температуре (20-25 °C) (рис. 4.52).



Рис. 4.52. Влияние температуры на отклик биосенсора на основе гТОР на внесение 0,56 мМ H₂O₂. Фермент был иммобилизован на поверхности электрода с использованием карбодиимидного метода без промежуточной отмывки от EDAC и sulfo-NHS. Измерения проводились в 20 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7) при постоянном приложенном потенциале 0,3 В по отношению к СВЭ.

Таким образом, проведённые исследования показали, способ что иммобилизации rTOP на электроде оказывает огромное влияние как на электрокаталитические свойства иммобилизованного фермента, так И на характеристики безмедиаторного биосенсора на его основе. В целом, химическая иммобилизация rTOP на поверхности графитового электрода даёт лучшие результаты по сравнению с физической адсорбцией фермента. При этом смена протокола химической иммобилизации со стандартного карбодиимидного метода, включающего отмывку активированного электрода от сшивающих агентов, на метод с одновременным нанесением на электрод растворов фермента и карбодиимида позволила существенно увеличить линейный диапазон определения H₂O₂, а также повысить операционную стабильность безмедиаторного биосенсора на основе rTOP.

5. ВЫВОДЫ

- Оптимизированы условия рефолдинга рекомбинантной пероксидазы табака (rTOP) из телец включения методом разведения. В результате эффективность рефолдинга rTOP при оптимизированных условиях по сравнению с ранее достигнутыми величинами увеличилась более, чем в 6 раз и составила около 85 %. Данная эффективность является одной из самых высоких для рефолдинга рекомбинантных белков из телец включения. Выход активной rTOP после двухстадийной очистки составил около 56 мг с 1 л культуральной среды.
- Проведено сравнение эффективности рефолдинга гТОР при использовании метода разведения и гель-фильтрационной хроматографии. Показано, что в случае последнего метода выход по активности примерно в 3 раза ниже по сравнению с оптимизированным методом разведения.
- 3. Изучено влияние ионов кальция на стабильность и каталитические свойства rTOP. Показано, что в присутствии ионов кальция pH-оптимум фермента не меняется, однако активность rTOP по отношению ко всем изученным ароматическим электрон-донорным субстратам (фенолу, гваяколу, ABTS и люминолу) при инкубации в среде, содержащей ионы кальция, снижается (на 20-40 % при инкубации с 20 мM Ca^{2+}). В то же время внесение ионов кальция повышает стабильность rTOP к термоинактивации (константа скорости термоинактивации rTOP при 52 °C ниже в 2 раза в присутствии 5 мM Ca^{2+}).
- 4. Получены конъюгаты гТОР и её мутантной формы гТОР-F140Y с антителами козы против IgG мыши. Синтезированные конъюгаты использованы для определения концентрации модельного объекта IgG мыши методом иммуноферментного анализа. Показано, что применение гТОР и гТОР-F140Y в качестве ферментной метки позволяет повысить интенсивность сигнала при колориметрической детекции по сравнению с коммерческим конъюгатом антител с пероксидазой из корней хрена (HRP) (в 3 и 2 раза, соответственно). При этом в случае гТОР-IgG чувствительность анализа выше по сравнению с

HRP-IgG во всем изученном диапазоне концентраций IgG мыши (при низких концентрациях – в 2 раза, при высоких – в 3 раза), а в случае rTOP- F140Y-IgG – в области высоких концентраций (в 3 раза). При детекции ферментной метки по хемилюминесценции интенсивность сигнала при использовании конъюгатов антител с rTOP и rTOP-F140Y выше по сравнению с HRP в 110 и 20 раз, соответственно. Также при детекции по хемилюминесценции rTOP-IgG и rTOP-F140Y-IgG обеспечивают более высокую чувствительность анализа по сравнению с HRP-IgG: в области низких концентраций аналита - в 49 и 11 раз, соответственно; в области высоких концентраций – в 54 и 23 раза, соответственно.

5. Изучено иммобилизации rTOP влияние способа на характеристики безмедиаторного биосенсора ДЛЯ определения концентрации пероксида водорода. Выявлено, что химическая иммобилизация rTOP на поверхности графитового электрода с использованием карбодиимидного метода по сравнению с физической адсорбцией фермента приводит к улучшению характеристик биосенсора: чувствительности – с 11 мА·М⁻¹·см⁻² при физической $55 \text{ MA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ адсорбции до при химической иммобилизации с последовательным нанесением сшивающих агентов (EDAC и sulfo-NHS) и фермента и 80 мА·М⁻¹·см⁻² при химической иммобилизации с одновременным нанесением rTOP, EDAC и sulfo-NHS; линейного диапазона - с 10-80 мкM H_2O_2 до 10-700 и 10-900 мкМ H₂O₂, соответственно. Показано, что ключевую роль в стабилизации rTOP при иммобилизации фермента путём совместной инкубации со сшивающими агентами играет образование внутри- и межмолекулярных ковалентных сшивок.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Koua D., Cerutti L., Falquet L., Sigrist C.J. a, Theiler G., Hulo N., Dunand C. PeroxiBase: A database with new tools for peroxidase family classification // Nucleic Acids Res. - 2009. - V. 37. - P. D261–D266.
- Welinder K.G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases // Curr. Opin. Struct. Biol. - 1992. - V. 2, № 3. - P. 388–393.
- Banci L. Structural properties of peroxidases. // J. Biotechnol. 1997. V. 53, № 2-3. - P. 253–263.
- Lagrimini L.M., Rothstein S. Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection // Plant Physiol. - 1987. - V. 84, № 2. - P. 438–442.
- Lagrimini L.M., Burkhart W., Moyer M., Rothstein S. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: Molecular analysis and tissue-specific expression. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. - 1987. - V. 84, № 21. - P. 7542–7546.
- Zielinska D.F., Gnad F., Wiśniewski J.R., Mann M. Precision mapping of an in vivo N-glycoproteome reveals rigid topological and sequence constraints // Cell. 2010. V. 141, № 5. P. 897–907.
- Diaz-De-Leon F., Klotz K.L., Lagrimini L.M. Nucleotide sequence of the tobacco (*Nicotiana tabacum*) anionic peroxidase gene. // Plant Physiol. - 1993. - V. 101, № 3. - P. 1117–1118.
- Hushpulian D.M., Savitski P. a., Rojkova a. M., Chubar T. a., Fechina V. a., Sakharov I.Y., Lagrimini L.M., Tishkov V.I., Gazaryan I.G. Expression and refolding of tobacco anionic peroxidase from *E. coli* inclusion bodies // Biochemistry (Moscow). - 2003. - V. 68, № 11. - P. 1189–1194.
- Roman R., Dumbord H.B. pH dependence of the oxidation of iodide by compound I of horseradish peroxidase // Biochemistry. - 1972. - V. 11, № 11. - P. 2076–2082.

- Araiso T., Miyoshi K., Yamazaki I. Mechanisms of electron transfer from sulfite to horseradish peroxidase-hydroperoxide compounds. // Biochemistry. - 1976. - V.
 15, № 14. - P. 3059–3063.
- Lagorce J.F., Thomes J.C., Catanzano G., Buxeraud J., Raby M., Raby C. Formation of molecular iodine during oxidation of iodide by the peroxidase/H₂O₂ system. Implications for antithyroid therapy. // Biochem. Pharmacol. - 1991. - V. 42 Suppl. - P. S89–S92.
- Modi S., Behere D. V, Mitra S. Interaction of thiocyanate with horseradish peroxidase. 1H and 15N nuclear magnetic resonance studies. // J. Biol. Chem. -1989. - V. 264, № 33. - P. 19677–19684.
- 13. Dunford H.B. Peroxidase-catalyzed halide ion oxidation. // Redox Rep. 2000. V.
 5, № 4. P. 169–171.
- 14. Veitch N.C., Gao Y., Smith A.T., White C.G. Identification of a critical phenylalanine residue in horseradish peroxidase, Phe179, by site-directed mutagenesis and 1H-NMR: Implications for complex formation with aromatic donor molecules // Biochemistry. - 1997. - V. 36, № 48. - P. 14751–14761.
- Berglund G.I., Carlsson G.H., Smith A.T., Szöke H., Henriksen A., Hajdu J. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. // Nature. 2002. V. 417, № 6887. P. 463–468.
- Poulos T.L., Freer S.T., Alden R. a., Xuong N.H., Edwards S.L., Hamlin R.C., Kraut J. Crystallographic determination of the heme orientation and location of the cyanide binding site in yeast cytochrome c peroxidase // J. Biol. Chem. - 1978. - V. 253, № 10. - P. 3730–3735.
- Poulos T.L., Freer S.T., Alden R. a, Edwards S.L., Skogland U., Takio K., Eriksson B., Xuong N., Yonetani T., Kraut J. The crystal structure of cytochrome c peroxidase. // J. Biol. Chem. 1980. V. 255, № 2. P. 575–580.
- Finzel B.C., Poulos T.L., Kraut J. Crystal structure of yeast cytochrome c peroxidase refined at 1.7-A resolution. // J. Biol. Chem. - 1984. - V. 259, № 21. - P. 13027–13036.

- Poulos T.L., Kraut J. The stereochemistry of peroxidase catalysis. // J. Biol. Chem.
 1980. V. 255, № 17. P. 8199–8205.
- 20. Vitello L.B., Erman J.E., Miller M. a, Mauro J.M., Kraut J. Effect of Asp-235->Asn substitution on the absorption spectrum and hydrogen peroxide reactivity of cytochrome c peroxidase. // Biochemistry. 1992. V. 31, № 46. P. 11524-11535.
- Vitello L.B., Erman J.E., Miller M. a, Wang J., Kraut J. Effect of arginine-48 replacement on the reaction between cytochrome c peroxidase and hydrogen peroxide. // Biochemistry. 1993. V. 32, № 37. P. 9807–9818.
- 22. Smith A., Santama N., Dacey S. Expression of a synthetic gene for horseradish peroxidase C in *Escherichia coli* and folding and activation of the recombinant enzyme with Ca²⁺ and heme // J. Biol. Chem. 1990. V. 265, № 22. P. 13335–13343.
- Gajhede M., Schuller D.J., Henriksen a, Smith a T., Poulos T.L. Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 A resolution. // Nat. Struct. Biol. 1997. V. 4, № 12. P. 1032–1038.
- 24. Newmyer, S L; de Montellano P.R.O. Horseradish peroxidase His-42-Ala, His-42-Val, and Phe-41-Ala mutants // J. Biol. Chem. 1995. V. 270, № 33. P. 19430–19438.
- 25. Rodriguez-Lopez J.N., Smith A.T., Thorneley R.N.F. Recombinant horseradish peroxidase isoenzyme C: the effect of distal haem cavity mutations (His42→Leu and Arg38→Leu) on compound I formation and substrate binding // J. Biol. Inorg. Chem. 1996. V. 1, № 2. P. 136–142.
- 26. Newmyer S.L., De Ortiz Montellano P.R. Rescue of the catalytic activity of an H42A mutant of horseradish peroxidase by exogenous imidazoles // J. Biol. Chem.
 1996. V. 271, № 25. P. 14891–14896.
- 27. Rodriguez-Lopez J.N., Smith A.T., Thorneley R.N.F. Role of arginine 38 in horseradish peroxidase: A critical residue for substrate binding and catalysis // J. Biol. Chem. 1996. V. 271, № 8. P. 4023–4030.

- Howes B.D., Rodriguez-Lopez J.N., Smith A.T., Smulevich G. Mutation of distal residues of horseradish peroxidase: Influence on substrate binding and cavity properties // Biochemistry. - 1997. - V. 36, № 6. - P. 1532–1543.
- 29. Sanders S.A., Bray R.C., Smith A.T. pH-dependent properties of a mutant horseradish peroxidase isoenzyme C in which Arg38 has been replaced with lysine.
 // Eur. J. Biochem. 1994. V. 224, № 3. P. 1029–1037.
- Feis A., Rodriguez-Lopez J.N., Thorneley R.N.F., Smulevich G. The distal cavity structure of carbonyl horseradish peroxidase as probed by the resonance Raman spectra of His 42 Leu and Arg 38 Leu mutants // Biochemistry. 1998. V. 37, № 39. P. 13575–13581.
- Rodriguez-Lopez J.N., Smith A.T., Thorneley R.N.F. Effect of distal cavity mutations on the binding and activation of oxygen by ferrous horseradish peroxidase // J. Biol. Chem. - 1997. - V. 272, № 1. - P. 389–395.
- Hiner A.N.P., Raven E.L., Thorneley R.N.F., García-Cánovas F., Rodríguez-López J.N. Mechanisms of compound I formation in heme peroxidases // J. Inorg. Biochem. 2002. V. 91, № 1. P. 27–34.
- 33. Henriksen A., Smith A.T., Gajhede M. The structures of the horseradish peroxidase C-ferulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates // J. Biol. Chem. 1999. V. 274, № 49. P. 35005–35011.
- 34. Veitch N.C. Structural determinants of plant peroxidase function // Phytochem.
 Rev. 2004. V. 3, № 1-2. P. 3–18.
- Arnao M.B., Acosta M., del Rio J. a., García-Cánovas F. Inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide and its protection by a reductant agent // Biochim. Biophys. Acta. - 1990. - V. 1038, № 1. - P. 85–89.
- Vlasits J., Jakopitsch C., Bernroitner M., Zamocky M., Furtmüller P.G., Obinger C. Mechanisms of catalase activity of heme peroxidases. // Arch. Biochem. Biophys. -2010. - V. 500, № 1. - P. 74–81.

- 37. Acosta M., Arnao M.B., del Río J. a., García-Cánovas F. Kinetic characterization of the inactivation process of two peroxidase isoenzymes in the oxidation of indolyl-3-acetic acid // Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol. 1989. V. 996, № 1-2. P. 7–12.
- 38. Wariishi H., Gold M.H. Lignin peroxidase compound III // FEBS Lett. 1989. V.
 243, № 2. P. 165–168.
- Hossain M.A., Asada K. Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: Its protection by ascorbate // Plant Cell Physiol. - 1984. - V. 25, № 7. - P. 1285–1295.
- Smith A.T., Doyle W. a, Dorlet P., Ivancich A. Spectroscopic evidence for an engineered, catalytically active Trp radical that creates the unique reactivity of lignin peroxidase. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009. V. 106, № 38. P. 16084–16089.
- Vidossich P., Alfonso-Prieto M., Carpena X., Loewen P.C., Fita I., Rovira C. Versatility of the electronic structure of compound I in catalase-peroxidases // J. Am. Chem. Soc. 2007. V. 129, № 44. P. 13436–13446.
- Nakajima R., Yamazaki I. The mechanism of oxyperoxidase formation from ferryl peroxidase and hydrogen peroxide. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262, № 6. P. 2576–2581.
- 43. Thorpe G.H.G., Kricka L.J., Moseley S.B., Whitehead T.P. Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: Application in luminescence-monitored enzyme immunoassays // Clin. Chem. 1985. V. 31, № 8. P. 1335–1341.
- Thorpe G.H., Kricka L.J., Gillespie E., Moseley S., Amess R., Baggett N., 44. T.P. Enhancement of the Whitehead horseradish peroxidase-catalyzed chemiluminescent oxidation of cyclic diacyl hydrazides by 6hydroxybenzothiazoles. // Anal. Biochem. - 1985. - V. 145, № 1. - P. 96–100.
- 45. Kricka L.J., Ji X., Thorpe G.H., Edwards B., Voyta J., Bronstein I. Comparison of 5-hydroxy-2, 3-dihydrophthalazine-1, 4-dione and luminol as co-substrates for

detection of horseradish peroxidase in enhanced chemiluminescent reactions. // J. Immunoassay. - 1996. - V. 17, № 1. - P. 67–83.

- 46. Kricka L.J., Ji X. 4-Phenylylboronic acid: a new type of enhancer for the horseradish peroxidase catalysed chemiluminescent oxidation of luminol. // J. Biolumin. Chemilumin. 1995. V. 10, № 1. P. 49–54.
- 47. Kricka L.J., Cooper M., Ji X. Synthesis and characterization of 4iodophenylboronic acid: a new enhancer for the horseradish peroxidase-catalyzed chemiluminescent oxidation of luminol. // Anal. Biochem. - 1996. - V. 240, № 1. -P. 119–125.
- Gazaryan I.G., Rubtsova M.Y., Kapeliuch Y.L., Rodriguez-Lopez J.N., Lagrimini L.M., Thorneley R.N.F. Luminol oxidation by hydrogen peroxide catalyzed by tobacco anionic peroxidase: Steady-state luminescent and transient kinetic studies // Photochem. Photobiol. - 1998. - V. 67, № 1. - P. 106.
- Poloznikov a. a., Zakharova G.S., Chubar T. a., Hushpulian D.M., Tishkov V.I., Gazaryan I.G. Site-directed mutagenesis of tobacco anionic peroxidase: Effect of additional aromatic amino acids on stability and activity // Biochimie. - 2015. - V. 115. - P. 71–77.
- 50. Hushpulian D.M., Poloznikov A.A., Savitski P.A., Rozhkova A.M., Chubar T.A., Fechina V.A., Lagrimini L.M., Tishkov V.I., Gazaryan I.G. Biocatalytic properties of recombinant tobacco peroxidase in chemiluminescent reaction // Biocatal. Biotransformation. - 2007. - V. 25, № 2-4. - P. 163–170.
- 51. Haschke R.H., Friedhoff J.M. Calcium-related properties of horseradish peroxidase
 // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1978. V. 80, № 4. P. 1039–1042.
- Howes B.D., Feis a, Raimondi L., Indiani C., Smulevich G. The critical role of the proximal calcium ion in the structural properties of horseradish peroxidase. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276, № 44. P. 40704–40711.
- 53. Ogawa S., Shiro Y., Morishima I. Calcium binding by horseradish peroxidase c and the heme environmental structure // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1979.
 V. 90, № 2. P. 674–678.

- 54. Morishima I., Kurono M., Shiro Y. Presence of endogenous calcium ion in horseradish peroxidase. Elucidation of metal-binding site by substitutions of divalent and lanthanide ions for calcium and use of metal-induced NMR (1H and 113Cd) resonances. // J. Biol. Chem. - 1986. - V. 261, № 20. - P. 9391–9399.
- Chattopadhyay K., Mazumdar S. Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: Effect of temperature and pH // Biochemistry. - 2000. - V.
 39, № 1. - P. 263–270.
- 56. Szigeti K., Smeller L., Osváth S., Majer Z., Fidy J. The structure of horseradish peroxidase C characterized as a molten globule state after Ca(2+) depletion. // Biochim. Biophys. Acta. Elsevier B.V., 2008. V. 1784, № 12. P. 1965–1974.
- 57. Smeller L., Meersman F., Fidy J., Heremans K. High-pressure FTIR study of the stability of horseradish peroxidase. Effect of heme substitution, ligand binding, Ca++ removal, and reduction of the disulfide bonds // Biochemistry. 2003. V. 42, № 2. P. 553-561.
- 58. Kaposi A.D., Fidy J., Manas E.S., Vanderkooi J.M., Wright W.W. Horseradish peroxidase monitored by infrared spectroscopy: Effect of temperature, substrate and calcium // Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol. 1999. V. 1435, № 1-2. P. 41–50.
- Laberge M., Szigeti K., Fidy J. The charge transfer band in horseradish peroxidase correlates with heme in-plane distortions induced by calcium removal. // Biopolymers. 2004. V. 74, № 1-2. P. 41–45.
- 60. Huang Q., Laberge M., Szigeti K., Fidy J., Schweitzer-Stenner R. Resonance Raman spectroscopy study of change of iron spin state in horseradish peroxidase C induced by removal of calcium. // Biopolymers. - 2003. - V. 72, № 4. - P. 241–248.
- Pappa H.S., Cass A.E.G. A step towards understanding the folding mechanism of horseradish peroxidase. Tryptophan fluorescence and circular dichroism equilibrium studies // Eur. J. Biochem. - 1993. - V. 212, № 1. - P. 227–235.
- 62. Maranon M.J.R., Stillman M.J., Vanhuystee R.B. Co-dependency of calcium and porphyrin for an integrated molecular structure of peanut peroxidase: A circular

dichroism analysis // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1993. - V. 194, № 1. - P. 326–332.

- Barber K.R., Rodriguez Maranon M.J., Shaw G.S., Huystee R.B. Structural influence of calcium on the heme cavity of cationic peanut peroxidase as determined by 1H-NMR spectroscopy // Eur. J. Biochem. 1995. V. 232, № 3. P. 825–833.
- 64. Van Huystee R.B., Xu Y., O'Donnell J.P. Variation in soret band absorption of peroxidase due to calcium // Plant Physiol. Biochem. 1992. V. 30, № 3. P. 293–297.
- McEldoon J.P., Pokora A.R., Dordick J.S. Lignin peroxidase-type activity of soybean peroxidase // Enzyme Microb. Technol. 1995. V. 17, № 4. P. 359–365.
- Iori, R. Cavalieri B., Palmieri S. Cathodic peroxidases of durum wheat flour // Cereal Chem. - 1995. - V. 72, № 2. - P. 176–181.
- 67. Timofeevski S.L., Aust S.D. Kinetics of calcium release from manganese peroxidase during thermal inactivation // Arch. Biochem. Biophys. 1997. V. 342, № 1. P. 169–175.
- Banci L., Bartalesi I., Ciofi-Baffoni S., Tien M. Unfolding and pH studies on manganese peroxidase: role of heme and calcium on secondary structure stability.
 // Biopolymers. 2003. V. 72, № 1. P. 38–47.
- 69. Sutherland G.R.J., Aust S.D. The effects of calcium on the thermal stability and activity of manganese peroxidase // Arch. Biochem. Biophys. 1996. V. 332, № 1. P. 128–134.
- Sutherland G.R.J., Zapanta L.S., Tien M., Aust S.D. Role of calcium in maintaining the heme environment of manganese peroxidase // Biochemistry. -1997. - V. 36, № 12. - P. 3654–3662.
- Sutherland G.R., Aust S.D. Thermodynamics of binding of the distal calcium to manganese peroxidase. // Biochemistry. - 1997. - V. 36, № 28. - P. 8567–8573.

- Timofeevski S.L., Aust S.D. Effects of Mn²⁺ and oxalate on the catalatic activity of manganese peroxidase // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997. V. 239, № 3.
 P. 645–649.
- 73. Nie G., Aust S.D. Influence of CaCl₂ and EDTA on reversible thermal inactivation of recombinant wild-type and mutant (E40H/E44H) *Phlebia radiata* manganese peroxidase 3 // Arch. Biochem. Biophys. 1997. V. 337, № 2. P. 225–231.
- 74. Nie G., Aust S.D. Effect of calcium on the reversible thermal inactivation of lignin peroxidase. // Arch. Biochem. Biophys. 1997. V. 337, № 2. P. 225–231.
- 75. George S.J., Kvaratskhelia M., Dilworth M.J., Thorneley R.N.F. Reversible alkaline inactivation of lignin peroxidase involves the release of both the distal and proximal site calcium ions and bishistidine co-ordination of the haem // Biochem. J. - 1999. - V. 344. - P. 237–244.
- Nie G., Aust S.D. Spectral changes of lignin peroxidase during reversible inactivation. // Biochemistry. - 1997. - V. 36, № 17. - P. 5113–5119.
- 77. Scott Reading N., Aust S.D. Role of disulfide bonds in the stability of recombinant manganese peroxidase // Biochemistry. 2001. V. 40, № 27. P. 8161–8168.
- Gazarian I.G., Lagrimini L.M., George S.J., Thorneley R.N.F. Anionic tobacco peroxidase is active at extremely low pH: veratryl alcohol oxidation with a pH optimum of 1.8 // Biochem. J. - 1996. - V. 372. - P. 369–372.
- 79. Munteanu F.-D., Gorton L., Lindgren A., Ruzgas T., Emnéus J., Csöregi E., Gazaryan I.G., Ouporov I. V, Mareeva E.A., Lagrimini L.M. Direct and mediated electron transfer catalyzed by anionic tobacco peroxidase: Effect of calcium ions // Appl. Biochem. Biotechnol. - 2000. - V. 88, № 1-3. - P. 321–334.
- Lagrimini L.M., Vaughn J., Finer J., Klotz K., Rubaihayo P. Expression of a chimeric tobacco peroxidase gene in transgenic tomato plants // J. Am. Soc. Hortic. Sci. 1992. V. 117, № 6. P. 1012–1016.
- Gazaryan I.G., Lagrimini L.M. Purification and unusual kinetic properties of a tobacco anionic peroxidase // Phytochemistry - 1996. - V. 41, № 4. - P. 1029–1034.

- Hushpulian D.M., Savitski P.A., Rojkova A.M., Chubar T.A., Fechina V.A., Sakharov I.Y., Lagrimini L.M., Tishkov V.I., Gazaryan I.G. Expression and refolding of tobacco anionic peroxidase from *E. coli* inclusion bodies // Biochemistry (Moscow). - 2003. - V. 68, № 11. - P. 1189–1194.
- 83. Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 72, № 2. P. 211–222.
- 84. Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* // Curr. Opin.
 Biotechnol. 1999. V. 10, № 5. P. 411–421.
- 85. Swartz J.R. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins // Curr. Opin. Biotechnol. - 2001. - V. 12, № 2. - P. 195–201.
- Clark E.D.B. Protein refolding for industrial processes // Curr. Opin. Biotechnol. -2001. - V. 12, № 2. - P. 202–207.
- Graumann K., Premstaller A. Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems // Biotechnol. J. - 2006. - V. 1, № 2. - P. 164–186.
- Saremirad P., Wood J.A., Zhang Y., Ray A.K. Multi-variable operational characteristic studies of on-column oxidative protein refolding at high loading concentrations // J. Chromatogr. A. - 2014. - V. 1359. - P. 70–75.
- Yamaguchi H., Miyazaki M. Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies // Biomolecules. 2014. V. 4, № 1. P. 235–251.
- Pan S., Zelger M., Hahn R., Jungbauer A. Continuous protein refolding in a tubular reactor // Chem. Eng. Sci. - 2014. - V. 116. - P. 763–772.
- 91. Nelson C.A., Lee C.A., Fremont D.H. Oxidative refolding from inclusion bodies // Structural Genomics and Drug Discovery: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1140 / ed. Anderson W.F. New York, NY: Springer New York, - 2014. - V. 1140. - P. 145–157.

- Noritomi H., Kato Y., Kato S. Efficient protein refolding using surfactants at high final protein concentration // J. Surf. Eng. Mater. Adv. Technol. 2014. V. 4. P. 9–13.
- 93. Ogura K., Kobashigawa Y., Saio T., Kumeta H., Torikai S., Inagaki F. Practical applications of hydrostatic pressure to refold proteins from inclusion bodies for NMR structural studies // Protein Eng. Des. Sel. 2013. V. 26, № 6. P. 409–416.
- 94. Malavasi N.V., Foguel D., Bonafe C.F.S., Braga C.A.C.A., Chura-Chambi R.M., Vieira J.M., Morganti L. Protein refolding at high pressure: Optimization using eGFP as a model // Process Biochem. - 2011. - V. 46, № 2. - P. 512–518.
- Basu A., Li X., Leong S.S.J. Refolding of proteins from inclusion bodies: Rational design and recipes // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2011. - V. 92. - P. 241–251.
- 96. Freydell E.J., van der Wielen L., Eppink M., Ottens M. Ion-exchange chromatographic protein refolding // J. Chromatogr. A. Netherlands, - 2010. - V. 1217, № 46. - P. 7265–7274.
- Alibolandi M., Mirzahoseini H. Chemical assistance in refolding of bacterial inclusion bodies // Biochem. Res. Int. - 2011. - V. 2011. - P. 631607.
- 98. Sakono M., Kawashima Y., Ichinose H., Maruyama T., Kamiya N., Goto M. Efficient refolding of inclusion bodies by reversed micelles // Kagaku Kogaku Ronbunshu. 2004. V. 30, № 4. P. 468–473.
- Raghava S., Barua B., Singh P.K., Das M., Madan L., Bhattacharyya S., Bajaj K., Gopal B., Varadarajan R., Gupta M.N. Refolding and simultaneous purification by three-phase partitioning of recombinant proteins from inclusion bodies // Protein Sci. - 2008. - V. 17. - P. 1987–1997.
- 100. Chiku H., Kawai A., Ishibashi T., Takehara M., Yanai T., Mizukami F., Sakaguchi K. A novel protein refolding method using a zeolite // Anal. Biochem. 2006. V. 348. P. 307–314.
- 101. Nara T.Y., Togashi H., Sekikawa C., Kawakami M., Yaginuma N., Sakaguchi K., Mizukami F., Tsunoda T. Use of zeolite to refold a disulfide-bonded protein // Colloids Surfaces B Biointerfaces. - 2009. - V. 68, № 1. - P. 68–73.

- 102. Gao M., Tong Y., Gao X., Yao W. PEGylation-aided refolding of globular adiponectin // World J. Microbiol. Biotechnol. - 2013. - V. 29, № 8. - P. 1525– 1530.
- 103. Shah S., Gupta M.N. Simultaneous refolding, purification and immobilization of xylanase with multi-walled carbon nanotubes // Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics. - 2008. - V. 1784, № 2. - P. 363–367.
- De M., Rotello V.M. Synthetic "chaperones": nanoparticle-mediated refolding of thermally denatured proteins // Chem. Commun. (Camb). - 2008. № 30. - P. 3504– 3506.
- 105. Yamaguchi H., Miyazaki M., Briones-Nagata M.P., Maeda H. Refolding of difficult-to-fold proteins by a gradual decrease of denaturant using microfluidic chips // J. Biochem. - 2010. - V. 147, № 6. - P. 895–903.
- De Bernardez Clark E., Schwarz E., Rudolph R. Inhibition of aggregation side reactions during *in vitro* protein folding // Methods Enzymol. - 1999. - V. 309. - P. 217–236.
- 107. Fischer B., Perry B., Sumner I., Goodenough P. A novel sequential procedure to enhance the renaturation of recombinant protein from *Escherichia coli* inclusion bodies // Protein Eng. - 1992. - V. 5, № 6. - P. 593–596.
- 108. Vallejo L.F., Rinas U. Optimized procedure for renaturation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at high protein concentration // Biotechnol. Bioeng.
 2004. V. 85, № 6. P. 601–609.
- 109. Kiefhaber T., Rudolph R., Kohler H.H., Buchner J. Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation // Biotechnology. (N. Y). - 1991. - V. 9, № 9. - P. 825–829.
- 110. Bushmarina N. a, Blanchet C.E., Vernier G., Forge V. Cofactor effects on the protein folding reaction: acceleration of alpha-lactalbumin refolding by metal ions.
 // Protein Sci. 2006. V. 15, № 4. P. 659–671.
- 111. Gazaryan I.G., Doseeva V.V., Galkin A.G., Tishkov V.I. Effect of single-point mutations Phe41-->His and Phe143-->Glu on folding and catalytic properties of

recombinant horseradish peroxidase expressed in *E. coli* // FEBS Lett. - 1994. - V. 354, № 3. - P. 248–250.

- 112. Rodriguez-Cabrera N. a, Regalado C., Garcia-Almendarez B.E. Cloning, heterologous expression and properties of a recombinant active turnip peroxidase // J. Agric. Food Chem. 2011. V. 59, № 13. P. 7120–7126.
- 113. Teilum K., Ostergaard L., Welinder K.G. Disulfide bond formation and folding of plant peroxidases expressed as inclusion body protein in *Escherichia coli* thioredoxin reductase negative strains // Protein Expr. Purif. - 1999. - V. 15, № 1. -P. 77-82.
- 114. Doyle W., Smith A. Expression of lignin peroxidase H8 in *Escherichia coli*: folding and activation of the recombinant enzyme with Ca²⁺ and haem // Biochem. J. 1996. V. 19, № 7. P. 55–58.
- 115. Whitwam R., Tien M. Heterologous expression and reconstitution of fungal Mn peroxidase // Arch. Biochem. Biophys. 1996. V. 333, № 2. P. 439–446.
- 116. Pérez-Boada M., Doyle W.A., Ruiz-Dueñas F.J., Martínez M.J., Martínez A.T., Smith A.T. Expression of *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase in *Escherichia coli* and optimisation of *in vitro* folding // Enzyme Microb. Technol. - 2002. - V. 30, № 4. - P. 518–524.
- Pham L.T.M., Kim S.J., Song B.K., Kim Y.H. Optimized refolding and characterization of S-peroxidase (CWPO_C of Populus alba) expressed in *E. coli* // Protein Expr. Purif. Elsevier Inc., 2011. V. 80, № 2. P. 268–273.
- 118. Mollania N., Khajeh K., Ranjbar B., Rashno F., Akbari N., Fathi-Roudsari M. An efficient *in vitro* refolding of recombinant bacterial laccase in *Escherichia coli* // Enzyme Microb. Technol. 2013. V. 52, № 6-7. P. 325–330.
- Nian R., Tan L., Yoo I.K., Choe W.S. Chaperone-assisted column refolding of gloshedobin with the use of refolding cocktail // J. Chromatogr. A. - 2008. - V. 1214. - P. 47–58.
- Novototskaya-Vlasova K., Petrovskaya L., Kryukova E., Rivkina E., Dolgikh D., Kirpichnikov M. Expression and chaperone-assisted refolding of a new cold-active

lipase from *Psychrobacter cryohalolentis* K5(T) // Protein Expr. Purif. - 2013. - V. 91, № 1. - P. 96–103.

- Haslbeck M. Recombinant expression and *in vitro* refolding of the yeast small heat shock protein Hsp42 // Int. J. Biol. Macromol. - 2006. - V. 38. - P. 107–114.
- Gerami S., Farajnia S., Mahboudi F., Babaei H. Optimizing refolding condition for recombinant tissue plasminogen activator // Iran J Biotechnol. - 2011. - V. 9, № 4. -P. 253–259.
- 123. Novinec M., Kovačič L., Škrlj N., Turk V., Lenarčič B. Recombinant human SMOCs produced by *in vitro* refolding: Calcium-binding properties and interactions with serum proteins // Protein Expr. Purif. - 2008. - V. 62. - P. 75–82.
- 124. Upadhyay A.K., Singh A., Mukherjee K.J., Panda A.K. Refolding and purification of recombinant L-asparaginase from inclusion bodies of *E. coli* into active tetrameric protein // Front. Microbiol. - 2014. - V. 5. - article 486.
- 125. Liu Y.C., Roujeinikova A. Expression, refolding, purification and crystallization of the sensory domain of the TlpC chemoreceptor from *Helicobacter pylori* for structural studies // Protein Expr. Purif. - 2015. - V. 107. - P. 29–34.
- 126. Wang Y., Ren W., Gao D., Wang L., Yang Y., Bai Q. One-step refolding and purification of recombinant human tumor necrosis factor-alpha (rhTNF-alpha) using ion-exchange chromatography // Biomed. Chromatogr. - 2015. - V. 29, № May. - P. 305–311.
- 127. Dang S., Hong T., Bu D., Tang J., Fan J., Zhang W. Optimized refolding and characterization of active C-terminal ADAMTS-18 fragment from inclusion bodies of *Escherichia coli* // Protein Expr. Purif. - 2012. - V. 82, № 1. - P. 32–36.
- 128. Leong S.S.J., Middelberg A.P.J. Dilution versus dialysis: A quantitative study of the oxidative refolding of recombinant human alpha-fetoprotein // Food Bioprod. Process. - 2006. - v. 84, № 1. - p. 9–17.
- Hevehan D.L., De Bernardez Clark E. Oxidative renaturation of lysozyme at high concentrations. // Biotechnol. Bioeng. - 1997. - V. 54, № 3. - P. 221–230.
- 130. Batas B., Chaudhuri J.B. Protein refolding at high concentration using sizeexclusion chromatography // Biotechnol. Bioeng. - 1996. - V. 50, № 1. - P. 16–23.
- Полозников А.А. Рекомбинантная пероксидаза табака: получение и каталитические свойства. - 2008.
- 132. Tsumoto K., Arakawa T., Chen L. Step-wise refolding of recombinant proteins // Curr. Pharm. Biotechnol. - 2010. - V. 11, № 3. - P. 285–288.
- West S.M., Chaudhuri J.B., Howell J. a. Improved protein refolding using hollowfibre membrane dialysis // Biotechnol. Bioeng. - 1998. - V. 57, № 5. - P. 590–599.
- 134. Wang G., Han J., Wang S., Li P. Expression and purification of recombinant human bone morphogenetic protein-7 in *Escherichia coli* // Prep. Biochem. Biotechnol. - 2014. - V. 44, № 1. - P. 16–25.
- 135. Yoshii H., Furuta T., Yonehara T., Ito D., Linko Y.Y., Linko P. Refolding of denatured/reduced lysozyme at high concentration with diafiltration // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. - 2000. - V. 64, № 6. - P. 1159–1165.
- 136. Middelberg A.P.J. Preparative protein refolding // Trends Biotechnol. 2002. V.
 20, № 10. P. 437–443.
- 137. Werner M.H., Clore G.M., Gronenborn a M., Kondoh A., Fisher R.J. Refolding proteins by gel filtration chromatography // FEBS Lett. - 1994. - V. 345, № 2-3. -P. 125–130.
- 138. Gu Z., Weidenhaupt M., Ivanova N., Pavlov M., Xu B., Su Z.-G., Janson J.-C. Chromatographic methods for the isolation of, and refolding of proteins from, *Escherichia coli* inclusion bodies // Protein Expr. Purif. - 2002. - V. 25, № 1. - P. 174–179.
- 139. Gu Z., Su Z., Janson J.C. Urea gradient size-exclusion chromatography enhanced the yield of lysozyme refolding // J. Chromatogr. A. - 2001. - V. 918, № 2. - P. 311–318.
- 140. Chen Y., Leong S.S.J. High productivity refolding of an inclusion body protein using pulsed-fed size exclusion chromatography // Process Biochem. 2010. V. 45, № 9. P. 1570–1576.

- 141. Fahey E.M., Chaudhuri J.B., Binding P. Refolding of low molecular weight urokinase plasminogen activator by dilution and size exclusion chromatography - a comparative study // Sep. Sci. Technol. - 2000. - V. 35, № 11. - P. 1743–1760.
- 142. Le P.U., Lenferink A.E.G., Pinard M., Baardsnes J., Massie B., O'Connor-McCourt M.D. *Escherichia coli* expression and refolding of E/K-coil-tagged EGF generates fully bioactive EGF for diverse applications // Protein Expr. Purif. -2009. - V. 64, № 2. - P. 108–117.
- 143. Lin Z., Lei H., Cao P. Expression, purification, and *in vitro* refolding of soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) // Protein Expr. Purif. - 2007. - V. 51. - P. 276–282.
- 144. Muller C., Rinas U. Renaturation of heterodimeric platelet-derived growth factor from inclusion bodies of recombinant *Escherichia coli* using size-exclusion chromatography // J. Chromatogr. A. - 1999. - V. 855, № 1. - P. 203–213.
- 145. Shalongo W., Ledger R., Jagannadham M. V, Stellwagen E. Refolding of denatured thioredoxin observed by size-exclusion chromatography // Biochemistry.
 1987. V. 26. P. 3135–3141.
- 146. Shi Z.X., He F., Wang L.L., Liang Y.M., Han H., Wang C.Z., Zhao Q., Geng X. Du. Expression, refolding, and purification of a truncated human Delta-like1, a ligand of Notch receptors // Protein Expr. Purif. 2008. V. 59. P. 242–248.
- 147. Schmoeger E., Wellhoefer M., Dürauer A., Jungbauer A., Hahn R. Matrix-assisted refolding of autoprotease fusion proteins on an ion exchange column: A kinetic investigation // J. Chromatogr. A. Elsevier B.V., - 2010. - V. 1217, № 38. - P. 5950–5956.
- 148. Langenhof M., Leong S.S.J., Pattenden L.K., Middelberg A.P.J. Controlled oxidative protein refolding using an ion-exchange column // J. Chromatogr. A. -2005. - V. 1069, № 2. - P. 195–201.
- 149. Chen Y., Leong S.S.J. Adsorptive refolding of a highly disulfide-bonded inclusion body protein using anion-exchange chromatography // J. Chromatogr. A. 2009. V. 1216, № 24. P. 4877–4886.

- 150. Wang F., Guo J., Bai Q., Wang L. Refolding and purification of recombinant human (Pro)renin receptor from *Escherichia coli* by ion exchange chromatography // Biotechnol. Prog. - 2014. - V. 30, № 4. - P. 864–871.
- 151. Wang L., Wang C., Geng X. Fast preparation of recombinant human stem cell factor from inclusion bodies using different hydrophobic interaction chromatographic columns // Chinese J. Chromatogr. / Zhongguo hua xue hui. -2011. - V. 29, № 1. - P. 36–41.
- 152. Kawano S., Iyaguchi D., Okada C., Sasaki Y., Toyota E. Expression, purification, and refolding of active recombinant human E-selectin lectin and EGF domains in *Escherichia coli* // Protein J. - 2013. - V. 32. - P. 386–391.
- 153. Molla G., Bernasconi M., Sacchi S., Pilone M.S., Pollegioni L. Expression in *Escherichia coli* and *in vitro* refolding of the human protein pLG72 // Protein Expr. Purif. - 2006. - V. 46. - P. 150–155.
- 154. Srivastava A.K., Sharma Y., Chary K.V.R. Overexpression, on-column refolding and isotopic labeling of Hahellin from *Hahella chejuensis*, a putative member of the betagamma-crystallin superfamily // Protein Expr. Purif. - 2008. - V. 58. - P. 269–274.
- 155. Fan X., Xu D., Lu B., Xia J., Wei D. Improving the refolding of NTA protein by urea gradient and arginine gradient size-exclusion chromatography // J. Biochem. Biophys. Methods. - 2008. - V. 70, № 6. - P. 1130–1138.
- 156. Lemercier G., Bakalara N., Santarelli X. On-column refolding of an insoluble histidine tag recombinant exopolyphosphatase from *Trypanosoma brucei* overexpressed in *Escherichia coli* // J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. - 2003. - V. 786, № 1-2. - P. 305–309.
- 157. Li M., Huang D. On-column refolding purification and characterization of recombinant human interferon-lambda1 produced in *Escherichia coli* // Protein Expr. Purif. - 2007. - V. 53, № 1. - P. 119–123.

- Hutchinson M.H., Chase H. a. Adsorptive refolding of histidine-tagged glutathione S-transferase using metal affinity chromatography // J. Chromatogr. A. - 2006. - V. 1128, № 1-2. - P. 125–132.
- 159. Rogl H., Kosemund K., Kühlbrandt W., Collinson I. Refolding of *Escherichia coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography // FEBS Lett. - 1998. - V. 432, № 1-2. - P. 21–26.
- 160. Zahn R., Von Schroetter C., Wüthrich K. Human prion proteins expressed in *Escherichia* cell and purified by high-affinity column refolding // FEBS Lett. -1997. - V. 417, № 3. - P. 400–404.
- 161. Stempfer G., Höll-Neugebauer B., Rudolph R. Improved refolding of an immobilized fusion protein // Nat. Biotechnol. 1996. V. 14, № 3. P. 329–334.
- Berdichevsky Y., Lamed R., Frenkel D., Gophna U., Bayer E. a, Yaron S., Shoham Y., Benhar I. Matrix-assisted refolding of single-chain Fv- cellulose binding domain fusion proteins // Protein Expr. Purif. 1999. V. 17, № 2. P. 249–259.
- 163. Tsumoto K., Umetsu M., Yamada H., Ito T., Misawa S., Kumagai I. Immobilized oxidoreductase as an additive for refolding inclusion bodies: application to antibody fragments // Protein Eng. - 2003. - V. 16, № 7. - P. 535–541.
- 164. Altamirano M.M., Golbik R., Zahn R., Buckle a M., Fersht a R. Refolding chromatography with immobilized mini-chaperones // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. - 1997. - V. 94, № 8. - P. 3576–3578.
- 165. Altamirano M.M., Woolfson A., Donda A., Shamshiev A., Briseño-Roa L., Foster N.W., Veprintsev D.B., De Libero G., Fersht a R., Milstein C. Ligand-independent assembly of recombinant human CD1 by using oxidative refolding chromatography // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2001. V. 98, № 6. P. 3288–3293.
- 166. Altamirano M.M., García C., Possani L.D., Fersht a R. Oxidative refolding chromatography: folding of the scorpion toxin Cn5 // Nat. Biotechnol. - 1999. - V. 17, № 2. - P. 187–191.

- Rodrigues D., Farinha-Arcieri L.E., Ventura A.M., Chura-Chambi R.M., Malavasi N. V., Lemke L.S., Guimarães J.S., Ho P.L., Morganti L. Effect of pressure on refolding of recombinant pentameric cholera toxin B // J. Biotechnol. 2014. V. 173. P. 98–105.
- 168. Okai M., Ohtsuka J., Asano A., Guo L., Miyakawa T., Miyazono K.I., Nakamura A., Okada A., Zheng H., Kimura K., Nagata K., Tanokura M. High pressure refolding, purification, and crystallization of flavin reductase from *Sulfolobus tokodaii* strain 7 // Protein Expr. Purif. 2012. V. 84, № 2. P. 214–218.
- 169. Lee S.-H., Carpenter J.F., Chang B.S., Randolph T.W., Kim Y.-S. Effects of solutes on solubilization and refolding of proteins from inclusion bodies with high hydrostatic pressure // Protein Sci. - 2006. - V. 15, № 2. - P. 304–313.
- 170. Schoner B.E., Bramlett K.S., Guo H., Burris T.P. Reconstitution of functional nuclear receptor proteins using high pressure refolding // Mol. Genet. Metab. -2005. - V. 85, № 4. - P. 318–322.
- 171. Crisman R.L., Randolph T.W. Refolding of proteins from inclusion bodies is favored by a diminished hydrophobic effect at elevated pressures // Biotechnol. Bioeng. 2009. V. 102, № 2. P. 483–492.
- 172. Arana M.E., Powell G.K., Edwards L.L., Kunkel T.A., Petrovich R.M. Refolding active human DNA polymerase nu from inclusion bodies // Protein Expr. Purif. -2010. - V. 70, № 2. - P. 163–171.
- 173. Zheng H., Miyakawa T., Sawano Y., Yamagoe S., Tanokura M. Expression, highpressure refolding and purification of human leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2) // Protein Expr. Purif. - 2013. - V. 88. - P. 221–229.
- 174. Cothran A., John R.J.S., Schmelzer C.H., Pizarro S. a. High-pressure refolding of human vascular endothelial growth factor (VEGF) recombinantly expressed in bacterial inclusion bodies: Refolding optimization, and feasibility assessment // Biotechnol. Prog. - 2011. - V. 27. - P. 1273–1281.
- 175. Balduino K.N., Spencer P.J., Malavasi N. V., Chura-Chambi R.M., Lemke L.S., Morganti L. Refolding by high pressure of a toxin containing seven disulfide

bonds: Bothropstoxin-1 from Bothrops jararacussu // Mol. Biotechnol. - 2011. - V. 48. - P. 228–234.

- 176. Fradkin A.H., Boand C.S., Eisenberg S.P., Rosendahl M.S., Randolph T.W. Recombinant murine growth hormone from *E. coli* inclusion bodies: Expression, high-pressure solubilization and refolding, and characterization of activity and structure // Biotechnol. Prog. - 2010. - V. 26. - P. 743–749.
- 177. Fraga T.R., Chura-Chambi R.M., Gonçales A.P., Morais Z.M., Vasconcellos S.A., Morganti L., Martins E.A.L. Refolding of the recombinant protein OmpA70 from *Leptospira interrogans* from inclusion bodies using high hydrostatic pressure and partial characterization of its immunological properties // J. Biotechnol. - 2010. - V. 148. - P. 156–162.
- 178. Bridgman P.W. The coagulation of albumen by pressure // J. Biol. Chem. 1914. V. 19, № 4. P. 511–512.
- 179. Ruan K., Weber G. Dissociation of yeast hexokinase by hydrostatic pressure // Biochemistry. - 1988. - V. 27, № 9. - P. 3295–3301.
- Tang G.-Q., Ruan K.-C. Pressure-induced dissociation of beef liver L-glutamate dehydrogenase // Prog. Biotechnol. - 1996. - V. 13. - P. 163–166.
- Kim Y.-S., Randolph T.W., Seefeldt M.B., Carpenter J.F. High-pressure studies on protein aggregates and amyloid fibrils // Methods Enzymol. - 2006. - V. 413. - P. 237–253.
- 182. Royer C.A. Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding // Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol. - 2002. - V. 1595, № 1-2.
 - P. 201–209.
- 183. Perrett S., Zhou J.M. Expanding the pressure technique: Insights into protein folding from combined use of pressure and chemical denaturants // Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol. 2002. V. 1595, № 1-2. P. 210–223.
- 184. Ribó M., Font J., Benito A., Torrent J., Lange R., Vilanova M. Pressure as a tool to study protein-unfolding/refolding processes: The case of ribonuclease A //

Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics. - 2006. - V. 1764, № 3. - P. 461– 469.

- 185. Qoronfleh M.W., Hesterberg L.K., Seefeldt M.B. Confronting high-throughput protein refolding using high pressure and solution screens // Protein Expr. Purif. -2007. - V. 55. - P. 209–224.
- 186. St. John R.J., Carpenter J.F., Balny C., Randolph T.W. High pressure refolding of recombinant human growth hormone from insoluble aggregates: Structural transformations, kinetic barriers, and energetics // J. Biol. Chem. - 2001. - V. 276. -P. 46856–46863.
- 187. St John R.J., Carpenter J.F., Randolph T.W. High pressure fosters protein refolding from aggregates at high concentrations // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. - 1999. -V. 96, № 23. - P. 13029–13033.
- Seefeldt M.B., Ouyang J., Froland W. a, Carpenter J.F., Randolph T.W. Highpressure refolding of bikunin: efficacy and thermodynamics // Protein Sci. - 2004. -V. 13. - P. 2639–2650.
- Chura-Chambi R.M., Genova L.A., Affonso R., Morganti L. Refolding of endostatin from inclusion bodies using high hydrostatic pressure // Anal. Biochem.
 2008. - V. 379. - P. 32–39.
- 190. Krishna Rao D.V., Tulasi Ramu C., Venkateswara Rao J., Lakshmi Narasu M., Bhujanga Rao A.K.S. Cloning, high expression and purification of recombinant human intereferon-beta-1b in *Escherichia coli* // Appl. Biochem. Biotechnol. -2009. - V. 158. - P. 140–154.
- 191. Rongen H. a H., Hoetelmans R.M.W., Bult a., Van Bennekom W.P. Chemiluminescence and immunoassays // J. Pharm. Biomed. Anal. 1994. V. 12, Nº 4. P. 433–462.
- 192. Dodeigne C., Thunus L., Lejeune R. Chemiluminescence as diagnostic tool. A review. // Talanta. - 2000. - V. 51, № 3. - P. 415–439.
- 193. White E.H., Bursey M.M. Chemiluminescence of luminol and related hydrazides: the light emission step // J. Am. Chem. Soc. - 1964. - V. 86, № 5. - P. 941–942.

- 194. Liang Y.L., Yu F., Yu S.C., Wu Y.J., Zhang H.Q., Qu L.B. Effect of the luminol signal enhancer on the chemiluminescence intensity and kinetics // J. Lumin. Elsevier, 2012. V. 132, № 4. P. 1021–1024.
- Burry R.W. Immunocytochemistry: A Practical Guide for Biomedical Research. -2010. 223 p.
- 196. Liu J.-Z., Wang T.-L., Huang M.-T., Song H.-Y., Weng L.-P., Ji L.-N. Increased thermal and organic solvent tolerance of modified horseradish peroxidase. // Protein Eng. Des. Sel. - 2006. - V. 19, № 4. - P. 169–173.
- 197. Chang B.S., Park K.H., Lund D.B. Thermal inactivation kinetics of horseradish peroxidase // J. Food Sci. - 1988. - V. 53, № 3. - P. 920–923.
- Chattopadhyay K., Mazumdar S. Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: effect of temperature and pH. // Biochemistry. - 2000. - V. 39, № 1. - P. 263–270.
- 199. O'Brien A.M., Ó'Fágáin C., Nielsen P.F., Welinder K.G. Location of crosslinks in chemically stabilized horseradish peroxidase: Implications for design of crosslinks // Biotechnol. Bioeng. 2001. V. 76, № 4. P. 277–284.
- 200. Liu J.-Z., Wang T.-L., Huang M.-T., Song H.-Y., Weng L.-P., Ji L.-N. Increased thermal and organic solvent tolerance of modified horseradish peroxidase // Protein Eng. Des. Sel. - 2006. - V. 19, № 4. - P. 169–173.
- 201. Hassani L., Ranjbar B., Khajeh K., Naderi-Manesh H., Naderi-Manesh M., Sadeghi M. Horseradish peroxidase thermostabilization: The combinatorial effects of the surface modification and the polyols // Enzyme Microb. Technol. 2006. V. 38, № 1-2. P. 118–125.
- 202. Sharma U., Pal D., Prasad R. Alkaline phosphatase: An overview // Indian J. Clin.
 Biochem. 2014. V. 29, № 3. P. 269–278.
- 203. Kim E.E., Wyckoff H.W. Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis. // J. Mol. Biol. 1991. V. 218, № 2. P. 449–464.

- 204. Mwilu S.K., Okello V. a., Osonga F.J., Miller S., Sadik O. a. A new substrate for alkaline phosphatase based on quercetin pentaphosphate // Analyst. 2014. V. 139, № 21. P. 5472–5481.
- 205. Hermanson G.T. Antibody Modification and Conjugation // Bioconjugate Techniques. 2nd ed. Rockford, Illinois, USA: Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, - 2008. - P. 783–823.
- 206. Manjappa A.S., Chaudhari K.R., Venkataraju M.P., Dantuluri P., Nanda B., Sidda C., Sawant K.K., Ramachandra Murthy R.S. Antibody derivatization and conjugation strategies: Application in preparation of stealth immunoliposome to target chemotherapeutics to tumor // J. Control. Release. 2011. V. 150, № 1. P. 2–22.
- 207. Sun M.M.C., Beam K.S., Cerveny C.G., Hamblett K.J., Blackmore R.S., Torgov M.Y., Handley F.G.M., Ihle N.C., Senter P.D., Alley S.C. Reduction-alkylation strategies for the modification of specific monoclonal antibody bisulfides // Bioconjug. Chem. 2005. V. 16, № 5. P. 1282–1290.
- 208. Hashida S., Ishikawa E. Use of normal IgG and its fragments to lower the non-specific binding of Fab'-enzyme conjugates in sandwich enzyme immunoassay // Anal. Lett. 1985. V. 18, № 9. P. 1143–1155.
- 209. Dewey R.E., Timothy D.H., Levings C.S. A mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T cytoplasm of maize. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1987. V. 84, № 15. P. 5374–5378.
- 210. Polson A.G. et al. Antibody-drug conjugates targeted to CD79 for the treatment of non-Hodgkin lymphoma // Blood. - 2007. - V. 110, № 2. - P. 616–623.
- 211. McDevitt M.R., Chattopadhyay D., Kappel B.J., Jaggi J.S., Schiffman S.R., Antczak C., Njardarson J.T., Brentjens R., Scheinberg D. a. Tumor targeting with antibody-functionalized, radiolabeled carbon nanotubes. // J. Nucl. Med. - 2007. -V. 48, № 7. - P. 1180–1189.

- 212. Partis M.D., Griffiths D.G., Roberts G.C., Beechey R.B. Cross-linking of protein by omega-maleimido alkanoylN-hydroxysuccinimido esters // J. Protein Chem. -1983. - V. 2, № 3. - P. 263–277.
- 213. Ishikawa , E., Imagawa , M., Hashida , S., Yoshitake , S. , Hamaguchi , Y. , and Ueno T. Enzyme labeling of antibodies // J. Immunoassay. 1983. V. 4. P. 209–327.
- 214. Smyth D.G. Acetylation of amino and tyrosine hydroxyl groups. Preparation of inhibitors of oxytocin with no intrinsic activity on the isolated uterus. // J. Biol. Chem. 1967. V. 242, № 7. P. 1592–1598.
- 215. Duncan R.J., Weston P.D., Wrigglesworth R. A new reagent which may be used to introduce sulfhydryl groups into proteins, and its use in the preparation of conjugates for immunoassay. // Anal. Biochem. - 1983. - V. 132, № 1. - P. 68–73.
- 216. Kulys J.J., Švirmickas G.-J.S. Reagentless lactate sensor based on cytochrome b2 //
 Anal. Chim. Acta. 1980. V. 117. P. 115–120.
- 217. Cass A.E.G., Davis G., Francis G.D., Hill H.A.O., Aston W.J., Higgins I.J., Plotkin E. V., Scott L.D.L., Turner A.P.F. Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose // Anal. Chem. 1984. V. 56, № 4. P. 667–671.
- 218. Wu Y., Hu S. Biosensors based on direct electron transfer in redox proteins // Microchim. Acta. - 2007. - V. 159, № 1-2. - P. 1–17.
- Ruzgas T., Gorton L. Kinetic models of horseradish peroxidase action on a graphite electrode // J. Electroanal. Chem. 1995. V. 391. P. 41–49.
- 220. Lindgren A., Tanaka M., Ruzgas T., Gorton L., Gazaryan I., Ishimori K., Morishima I. Direct electron transfer catalysed by recombinant forms of horseradish peroxidase: insight into the mechanism // Electrochem. Commun. -1999. - V. 1, № 5. - P. 171–175.
- 221. Presnova G., Grigorenko V., Egorov a, Ruzgas T., Lindgren a, Gorton L., Börchers T. Direct heterogeneous electron transfer of recombinant horseradish peroxidases on gold. // Faraday Discuss. 2000. № 116. P. 281–289; discussion 335–351.

- 222. Armstrong F.A., Lannon A.M. Fast interfacial electron transfer between cytochrome c peroxidase and graphite electrodes promoted by aminoglycosides: novel electroenzymic catalysis of hydrogen peroxide reduction // J. Am. Chem. Soc. 1987. V. 109, № 23. P. 7211–7212.
- 223. Csöregi E., Jönsson-Pettersson G., Gorton L. Mediatorless electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at graphite electrodes chemically modified with peroxidases // J. Biotechnol. - 1993. - V. 30, № 3. - P. 315–337.
- 224. Ruzgas T., Gorton L., Emneus J., Csöregi E., Marko-Varga G. Direct bioelectrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at chloroperoxidase modified graphite electrode // Anal. Proc. Incl. Anal. Commun. - 1995. - V. 32, № 6. - P. 207.
- 225. Gaspar S., Popescu I.C., Gazaryan I.G., Bautistac A.G., Sakharov I.Y., Mattiassona B., Csöregi E. Biosensors based on novel plant peroxidases: a comparative study // Electrochim. Acta. 2000. V. 46, № 2-3. P. 255–264.
- 226. Ferapontova E.E., Castillo J., Hushpulian D., Tishkov V., Chubar T., Gazaryan I., Gorton L. Direct electrochemistry of recombinant tobacco peroxidase on gold // Electrochem. commun. 2005. V. 7, № 12. P. 1291–1297.
- 227. Gazaryan I.G., Gorton L., Ruzgas T., Csoregi E., Schuhmann W., Lagrimini L.M., Khushpul'yan D.M., Tishkov V.I. Tobacco peroxidase as a new reagent for amperometric biosensors // J. Anal. Chem. - 2005. - V. 60, № 6. - P. 558–566.
- 228. Castillo J., Ferapontova E., Hushpulian D., Tasca F., Tishkov V., Chubar T., Gazaryan I., Gorton L. Direct electrochemistry and bioelectrocatalysis of H₂O₂ reduction of recombinant tobacco peroxidase on graphite. Effect of peroxidase single-point mutation on Ca²⁺-modulated catalytic activity // J. Electroanal. Chem. 2006. V. 588, № 1. P. 112–121.
- 229. Lindgren A., Ruzgas T., Gorton L., Csöregi E., Bautista Ardila G., Sakharov I.Y., Gazaryan I.G. Biosensors based on novel peroxidases with improved properties in direct and mediated electron transfer // Biosens. Bioelectron. - 2000. - V. 15, № 9-10. - P. 491–497.

- 230. Maste M., Norde W., Visser A. Adsorption-induced conformational changes in the serine proteinase savinase: A tryptophan fluorescence and circular dichroism study.
 // J. Colloid Interface Sci. 1997. V. 196, № 2. P. 224–230.
- 231. Giacomelli C.E., Norde W. Conformational changes of the amyloid beta-peptide (1-40) adsorbed on solid surfaces. // Macromol. Biosci. 2005. V. 5, № 5. P. 401–407.
- 232. Sharma S., Berne B.J., Kumar S.K. Thermal and structural stability of adsorbed proteins // Biophys. J. Biophysical Society, 2010. V. 99, № 4. P. 1157–1165.
- 233. Ballet T., Boulange L., Brechet Y., Bruckert F., Weidenhaupt M. Protein conformational changes induced by adsorption onto material surfaces: an important issue for biomedical applications of material science // Bull. Polish Acad. Sci. Tech. Sci. 2010. V. 58, № 2. P. 303-313.
- 234. Хушпулян Д.М., Савицкий П.А., Рожкова А.М., Чубарь Т.А., Фечина В.А., Сахаров И.Ю., Лагримини Л.М., Тишков В.И., Газарян И.Г. Экспрессия анионной пероксидазы табака в клетках *Escherichia coli* и ее рефолдинг из телец включения // Биохимия. 2003. V. 68, № 11. Р. 1480–1487.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. - 1970. - V. 227. - P. 680–685.
- 236. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // Anal. Biochem. - 1976. - V. 72. - P. 248–254.
- 237. Kalb V.F., Bernlohr R.W. A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts // Anal. Biochem. 1977. V. 82, № 2. P. 362–371.
- 238. Childs R.E., Bardsley W.G. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid) as chromogen // Biochem. J. -1975. - V. 145. - P. 93–103.
- 239. Hildebraunt a G., Roots I. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent formation and breakdown of hydrogen peroxide during

mixed function oxidation reactions in liver microsomes. // Arch. Biochem. Biophys. - 1975. - V. 171, № 2. - P. 385–397.

- 240. Hiner a N., Rodríguez-López J.N., Arnao M.B., Lloyd Raven E., García-Cánovas F., Acosta M. Kinetic study of the inactivation of ascorbate peroxidase by hydrogen peroxide. // Biochem. J. 2000. V. 348. P. 321–328.
- 241. Gallati H. Enzyme-immunological tests: determination of the activity of peroxidase with the aid of the "Trinder reagent" // J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1977. V. 15, № 12. P. 699–703.
- 242. Vaz-Dominguez C., Campuzano S., Rüdiger O., Pita M., Gorbacheva M., Shleev S., Fernandez V.M., De Lacey A.L. Laccase electrode for direct electrocatalytic reduction of O₂ to H₂O with high-operational stability and resistance to chloride inhibition // Biosens. Bioelectron. 2008. V. 24, № 4. P. 531–537.
- 243. Buchner J., Pastan I., Brinkmann U. A method for increasing the yield of properly folded recombinant fusion proteins: Single-chain immunotoxins from renaturation of bacterial inclusion bodies // Anal. Biochem. - 1992. - V. 205, № 2. - P. 263–270.
- 244. Asad S., Dabirmanesh B., Ghaemi N., Etezad S.M., Khajeh K. Studies on the refolding process of recombinant horseradish peroxidase // Mol. Biotechnol. 2013. V. 54, № 2. P. 484–492.
- 245. Henriksen a, Mirza O., Indiani C., Teilum K., Smulevich G., Welinder K.G., Gajhede M. Structure of soybean seed coat peroxidase: a plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions. // Protein Sci. 2001. V. 10, № 1. P. 108–115.
- 246. Astergaard L., Teilum K., Mirza O., Mattsson O., Petersen M., Welinder K.G., Mundy J., Gajhede M., Henriksen A. Arabidopsis ATP A2 peroxidase. Expression and high-resolution structure of a plant peroxidase with implications for lignification // Plant Mol. Biol. - 2000. - V. 44, № 2. - P. 231–243.
- 247. Doyle W., Smith A. Expression of lignin peroxidase H8 in *Escherichia coli*: folding and activation of the recombinant enzyme with Ca²⁺ and haem // Biochem. J. 1996. V. 315. P. 15–19.

- 248. Guise A.D., Chaudhuri J.B. Initial protein concentration and residual denaturant concentration strongly affect the batch refolding of hen egg white lysozyme // Biotechnol. Bioprocess Eng. 2001. V. 6, № 6. P. 410–418.
- 249. Orsini G., Goldberg M.E. The renaturation of reduced chymotrypsinogen A in guanidine HCl. Refolding versus aggregation // J. Biol. Chem. 1978. V. 253, № 10. P. 3453-3458.
- 250. Miki Y., Morales M., Ruiz-Dueñas F.J., Martínez M.J., Wariishi H., Martínez A.T. *Escherichia coli* expression and *in vitro* activation of a unique ligninolytic peroxidase that has a catalytic tyrosine residue // Protein Expr. Purif. 2009. V. 68, № 2. P. 208–214.
- 251. Wu T.-P., Zheng L., Ruan K.-C. Effect of calcium ion on conformation of horseradish peroxidase isoenzyme C. // Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai). - 1998. - V. 30, № 5. - P. 510–514.
- 252. Rasmussen C.B., Hiner a. N.P., Smith a. T., Welinder K.G. Effect of calcium, other ions, and ph on the reactions of barley peroxidase with hydrogen peroxide and fluoride: Control of activity through conformational change // J. Biol. Chem. 1998. V. 273, № 4. P. 2232–2240.
- 253. Geng X., Wang L. Liquid chromatography of recombinant proteins and protein drugs // J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2008. V. 866, № 1-2. P. 133–153.
- 254. Wang L., Geng X. Protein renaturation with simultaneous purification by protein folding liquid chromatography: Recent developments // Amino Acids. 2014. V. 46, № 1. P. 153–165.
- 255. Wellhoefer M., Sprinzl W., Hahn R., Jungbauer A. Continuous processing of recombinant proteins: Integration of inclusion body solubilization and refolding using simulated moving bed size exclusion chromatography with buffer recycling. // J. Chromatogr. A. - 2013. - V. 1319. - P. 107–117.

- 256. Freydell E.J., Bulsink Y., van Hateren S., van der Wielen L., Eppink M., Ottens M. Size-exclusion simulated moving bed chromatographic protein refolding // Chem. Eng. Sci. 2010. V. 65, № 16. P. 4701–4713.
- 257. Batas B., Chaudhuri J.B. Considerations of sample application and elution during size-exclusion chromatography-based protein refolding // J. Chromatogr. A. 1999.
 V. 864, № 2. P. 229–236.
- 258. Freydell E.J., van der Wielen L.A.M., Eppink M.H.M., Ottens M. Size-exclusion chromatographic protein refolding: Fundamentals, modeling and operation // J. Chromatogr. A. - 2010. - V. 1217, № 49. - P. 7723–7737.
- 259. Macedo J.M.B., Gottschalk L.M.F., Bon E.P.S. Calcium carbonate mediates higher lignin peroxidase activity in the culture supernatant of *Streptomyces viridosporus* T7A // Brazilian J. Chem. - 1999. - V. 16, № 2. - P. 163–169.
- 260. Laviron E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems // J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem. 1979. V. 101, № 1. P. 19–28.