

БИОАРГАНИЧНАЯ ХИМИЯ
BIOORGANIC CHEMISTRY

УДК 577.322.23

Поступила в редакцию 03.03.2017
Received 03.03.2017**А. В. Свирид, А. Я. Лущик, А. А. Гилеп, С. А. Усанов***институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь***САЙТ-СПЕЦИФИЧНОЕ БИОТИНИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ,
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА МИКРОЧАСТИЦАХ,
РЕКОМБИНАНТНОЙ БИОТИН ЛИГАЗОЙ**

Аннотация. С целью получения каталитически активной рекомбинантной биотин лигазы (rBirA) разработан подход к получению сшитого белка MBP-BirA путем гетерологической экспрессии в клетках *E. coli*, с последующей его очисткой и высвобождением rBirA с помощью высокоспецифичного протеолиза TEV протеазой. Рекомбинантный белок получен в гомогенном состоянии и обладает специфической каталитической активностью. Использование иммобилизации на магнитных микрочастицах позволило разработать подход к эффективному ферментативному биотинилированию, совмещенному с очисткой целевых белковых молекул на аффинной матрице.

Ключевые слова: BirA биотин лигаза, белок MBP, молекулярное клонирование, гетерологическая экспрессия, сайт-специфичное биотинилирование

Для цитирования. Сайт-специфичное биотинилирование белков и пептидов, иммобилизованных на микро-частицах, рекомбинантной биотин лигазой / А. В. Свирид [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 4. – С. 62–73.

A. V. Svirid, A. Ya. Lushchyk, A. A. Gilep, S. A. Usanov*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus***BIOTIN LIGASE FOR SITE SPECIFIC BIOTINYLATION OF PROTEINS
AND PEPTIDES IMMOBILIZED ON MICROPARTICLES**

Abstract. To obtain catalytically active recombinant biotin ligase (rBirA), we developed an approach for heterologous expression of BirA-MBP-fusion protein in *E. coli* cells, its purification and subsequent rBirA release by highly specific proteolysis using TEV protease. The recombinant protein is obtained in homogeneous state and retains specific catalytic activity. Enzyme immobilization on magnetic microparticles has allowed to develop an approach for effective enzymatic biotinylation combined with purification of target protein molecules on the affinity matrix.

Keywords: BirA biotin ligase, MBP protein, molecular cloning, heterologous expression, site-specific biotinylation

For citation. Svirid A. V., Lushchyk A. Ya., Gilep A. A., Usanov S. A. Biotin ligase for site specific biotinylation of proteins and peptides immobilized on microparticles. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk=Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Chemical series*, 2017, no. 4, pp. 62–73 (In Russian).

Введение. Для описания и выяснения молекулярных механизмов функционирования биомолекул, обеспечивающих протекание ряда важнейших биологических процессов, очень важным является возможность наблюдения за поведением белковых молекул в тканях и клетках, равно как и их селективное выделение и очистка. Направленное мечение белков низкомолекулярными веществами придает им новые химические и физические свойства, что позволяет исследовать целевой белок или манипулировать им с помощью определенных специфических подходов.

Традиционные методы мечения положительно заряженных аминокислот, свободных остатков цистеина и N'-концевых аминокислот, имеют ряд недостатков, в том числе слабую специфичность и необходимость проведения реакции в условиях неблагоприятных для ряда белков. В связи с широким распространением технологии рекомбинантных белков разработано множество раз-

личных способов мечения белковых доменов, небольших пептидов или отдельных аминокислот путем изменения первичной последовательности целевых белков введением в их структуру маркерных последовательностей. В таблице представлены наиболее часто используемые на данный момент для этих целей метки («tags») [1].

Наиболее функциональным и стабильным показало себя мечение биотином. Биотин является кофактором карбоксилаз, которые присутствуют во всех живых организмах, кроме того, он способен образовывать комплексы с белками авидином и стрептавидином с $K_d \sim 10^{-15}$ М и $K_d \sim 10^{-14}$ М соответственно [2]. Связывание стрептавидаина с биотином происходит с высокой скоростью, специфично и протекает даже в денатурирующих для многих белков условиях, например при высоких температурах (вплоть до 110 °С при полном насыщении лигандом) [3] или в присутствии 6М гуанидина гидрохлорида и 1%-ного додецилсульфата натрия (SDS) [4].

Сравнительная характеристика меток белковой и пептидной природы

Comparison of protein-based and peptide-based tags

Метка	Размер (АК)	Механизм мечения	Стабильность комплекса (K_d)
Дегалогеназа	297	Эфирная связь с алкилгалогенидами	Ковалентная связь
FKBP12(F36V)	108	Взаимодействие с конъюгатами SLF ⁷	0,01 нМ
Одноцепочечные антитела	230–300	Взаимодействие с конъюгатами фосфинооксазолина (флуорофорами)	1–10 нМ
Тетрацистеин	12	Тиол-арсенидная связь с биарсенидными конъюгатами	0,01–1 нМ
Полигистидин	6	Взаимодействие с конъюгатами хелаторов цинка	40–1400 нМ
Лантанид-связывающая метка	14	Взаимодействие с лантанидами	220 нМ
TR514	38	Взаимодействие с производными Texas Red	0,025 нМ
Биотин-акцепторный пептид	15–75	Амидная связь с биотином и аналогами	Ковалентная связь
Акцепторный пептид липоевой кислоты	22	Амидная связь с конъюгатами липоевой кислоты	Ковалентная связь
Фосфопантотеинил	15	Фосфоэфирная связь с конъюгатами КоА	Ковалентная связь
Sortag	5	Амидная связь с пентаглициновыми конъюгатами	Ковалентная связь
Q-tag	4–7	Амидная связь с первичными аминами	Ковалентная связь
Метка для фарнезиллирования	4	Тиоэфирная связь с пренилдифосфатными конъюгатами	Ковалентная связь

Биотинилирование очищенных белков применяется в широком спектре областей биохимии и клеточной биологии.

- Иммунохимические методы и высокоточная детекция – пару биотин-стрептавидин широко используют для многократного усиления сигнала при проведении иммуноферментного анализа. Кроме того, биотинилированный *in vitro* белок можно внести в клетки и затем детектировать конъюгатами со стрептавидином [5]. Использование моновалентного стрептавидаина упрощает задачу эффективного измерения абсолютного числа биотин-связывающих сайтов в клетке [6].

- Тетрамеризация – увеличение avidности связывания лиганда. Например, молекула МНС I класса тетрамеризуется с помощью стрептавидаина и стабильно связывается с Т-клеточным рецептором, что позволяет наблюдать за иммунным ответом и выделять Т-клетки с антипатогенной и антираковой активностью [7].

- Конъюгация – в наносборках стрептавидин часто используется в качестве «мостика» между биотинилированным белком и другой биотинилированной молекулой (ДНК, углеводы, липиды или низкомолекулярные вещества) [8].

- Имобилизация – связывание со стрептавидином высокоаффинно и стабильно во времени в широком диапазоне рН среды. Биотинилированные BirA белки часто используются для захвата на хроматографических колонках, чипах (например, для поверхностного плазмонного резонанса или next-gen секвенирования) [9], иглах атомно-силовых микроскопов [10] или наночастиц (квантовых точек или магнитных частиц) [11].

Долгое время было доступно только биотинилирование с помощью химической модификации первичных аминов, карбоксильных и сульфгидрильных групп белков. N'-гидроксисукцинимидные (NHS) эфиры биотина являются наиболее часто используемыми реагентами для биотинилирования. Их мишенями являются первичные амины, обычно это N'-концевые свободные аминогруппы и эпсилон-аминогруппы поверхностных лизинов. Очевидные минусы такого подхода состоят в том, что для оптимального протекания реакции требуются щелочные условия (pH 9,5) и присутствие в реакционной среде органического растворителя, так как NHS-эфир биотина слабо растворим в воде. Кроме того, такой подход не позволяет выбирать какие из поверхностных остатков лизина будут модифицированы, что может повлечь нарушение функции модифицируемой белковой молекулы [12] или гетерогенность белкового состава раствора, из-за различного количества прореагировавших боковых цепей.

Наиболее значимым технологическим усовершенствованием в использовании биотина для модификации белков явилось использование собственных механизмов клетки для конъюгации биотина – ковалентное мечение пептидной последовательности целевого белка с помощью фермента *E. coli* BirA (биотин-протеин лигаза, биотин лигаза, КФ 6.3.4.15).

Связывание биотина происходит при узнавании ферментом специфической пептидной последовательности по боковой цепи остатка лизина. Для протекания реакции требуется энергия в виде АТФ (схема реакции представлена на рис. 1).

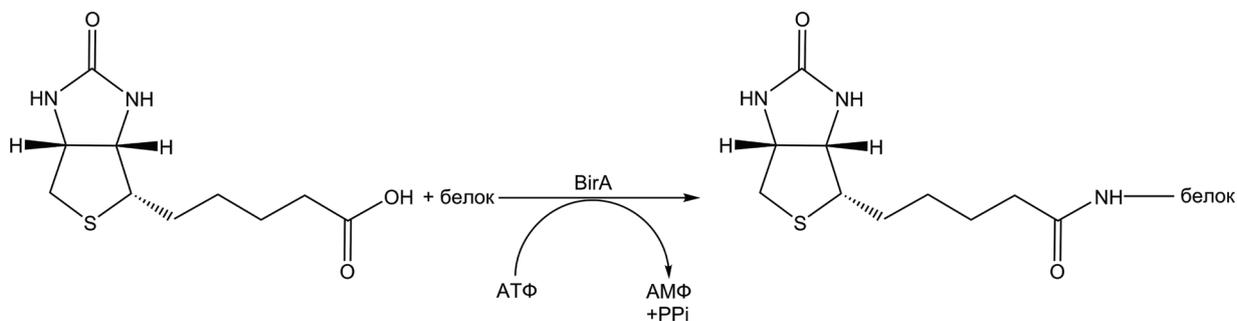


Рис. 1. Схема реакции биотинилирования BirA биотин лигазой

Fig. 1. Biotinylation reaction with BirA biotin ligase

Природным субстратом BirA является карбоксибиотин-переносящий белок (ВССР), поэтому изначально предполагалось слияние 75 аминокислот его последовательности с целевым белком [13]. Однако с помощью технологии фагового дисплея удалось оптимизировать последовательность, уменьшив ее до 15 аминокислот (GLNDIFEAQKIEWHE), которую назвали AviTag (последовательность также известна под названием биотин-акцепторного пептида (BAP)) [14], при этом связывающий центр остался неизменным. Это значительно расширило спектр белков, к которым можно применять сайт-специфичное ферментативное биотинилирование.

В ряде работ показано, что BirA может биотинилировать такие пептиды в составе белков как в цитозоле [15], так и в секреторных метаболических путях, на поверхности клеток млекопитающих и беспозвоночных [16–19].

Модификация стрептавидина играет важную роль в расширении применения BirA для мечения биомолекул; в частности, варианты с контролируемой валентностью (например, одновалентный стрептавидин, MSA) позволяют четко контролировать сборку конъюгатов [10]. Кроме того, был получен стрептавидин со сниженной в 10 раз скоростью диссоциации биотина и повышенной термической стабильностью (траптавидин) [20].

Подход с использованием биотинилирования *in vivo* с помощью коэкспрессии целевого белка, несущего Avi-tag, и BirA с плазмиды с дополнительной копией гена [13] имеет ряд неоспоримых преимуществ, в числе которых простота подхода и малые трудозатраты, но тем не менее у него есть и существенные недостатки. Эффективность биотинилирования варьирует в достаточно широких пределах, а уровень экспрессии дополнительной копии гена BirA находится

в обратной зависимости от уровня экспрессии целевого белка. Более того, ряд субстратов имеет тенденцию к снижению уровня биотинилирования во время хранения [18]. Поэтому целесообразным является разработка методики получения рекомбинантной биотин лигазы для *in vitro* биотинилирования.

Зачастую аффинно связанные с матрицей (частицей) белковые биомолекулы могут подвергаться конформационным изменениям, повышая таким образом стабильность и улучшая кинетические параметры [21]. Прямое ферментативное биотинилирование иммобилизованных на частицах молекул в таком случае должно протекать, как минимум, не менее эффективно, более того, снижать трудозатраты и ускорять процесс выделения целевых молекул с аффинными метками.

В представленной работе нами разработан новый подход к получению растворимой BirA биотин лигазы путем гетерологической экспрессии в клетках *E. coli* BL21(DE3) и ее очистки до гомогенного состояния. Кроме того, нами показана принципиальная возможность проведения сайт-специфичного *in vitro* биотинилирования мишеней пептидной и белковой природы, аффинно иммобилизованным на магнитных частицах ферментом.

Материалы и методы исследования. В работе использовали следующие реактивы: Tris основной, этилен-диаминотетраацетат натрия (Na-ЭДТА), кумасси бриллиантовый голубой R-250, АТФ динатриевая соль, додецилсульфат натрия (SDS), имидазол («Sigma», США); агароза, изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) («Gibco BRL», США); смесь dNTP, термостабильная Phusion ДНК-полимераза и буфер для амплификации («Thermo Scientific», Литва), Ni-NTA-Agarose («Qiagen», США); Vacto-Tryptone, Vacto-Peptone и Vacto-Yeast экстракт («Difco Laboratories», США); рестриктазы и ферменты модификации ДНК («New England Biolabs», США), маркер молекулярного веса #26620, Streptavidin-HRP, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) («Pierce», США); («AppliChem»); Millipore PureProteome Ni-NTA магнитные микрочастицы («Merck Millipore», Германия); Fmoc-аминокислоты для синтеза, смола Rink amide («INTAVIS Bioanalytical Instruments», Германия); HBTU («Iris Biotech», Германия), трифторуксусная кислота, D(+)-биотин («AppliChem», Германия); PBS буферные таблетки («Melford», Великобритания) триизопропил силан, метилтретбутиловый эфир, пиперидин, дихлорметан, диметилформамид («Alfa Aesar», США), TEV протеаза (ИБОХ НАН Беларуси).

Для получения достаточных количеств биотин лигазы в растворимом виде нами применен подход экспрессии сшитого белка BirA с мальтоза-связывающим белком (MBP). Высвобождение лигазы из сшитого белкового комплекса осуществляли TEV протеазой. В дальнейшем BirA получали с помощью пропускания полученной смеси через колонку с металл-аффинным сорбентом. BirA, в отличие от сшитого белкового комплекса и MBP, несущих полигистидиновый кластер, не связывается с сорбентом.

Клонирование ДНК BirA. Амплификацию проводили в амплификаторе BioRad T100 при следующих условиях: денатурация 94 °С 4 мин; 30 циклов – денатурация 94 °С 1 мин, отжиг – 60 °С 1 мин, элонгация – 72 °С 1 мин. Заключительный этап элонгации – 72 °С 10 мин. Амплифицированные фрагменты разделяли методом гель-электрофореза в 1%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия (результаты регистрировали с помощью видеосистемы Gel Imager 2 («Vilber Lourmat», Франция). В каждом случае проводили положительный и отрицательный контроль амплификации.

Ген MBP амплифицировали в составе плазмиды pTEV6His5Arg_MBP [22] с помощью следующих праймеров: ggAATTCCATATgAAAATCgAAAgAaggTAAACTggTA (прямой праймер, несущий сайт рестрикции *NdeI*), CgCggATCCTCCCCTTCCCCTCgATCCCgAggTgTgTgTT (обратный праймер, несущий сайт рестрикции *BamHI*). ПЦР-продукт был подвергнут рестрикции по сайтам *NdeI* и *BamHI* и лигирован в вектор pET-28a («Novagen», США), подвергшийся рестрикции по тем же сайтам.

Ген BirA был амплифицирован с помощью следующих праймеров, используя плазмиду pBirAcm («Avidity LLC», США) в качестве матрицы: CCggAATTCCgAAAACCTgTATTTCCAgggCATGAaggATAACACCgTgCCACTg (прямой праймер, несущий сайт рестрикции *EcoRI* и сайт узнавания для TEV протеазы), ATAAGaATgCggCCgCTTATTTTTCTgCACTACgCAgggATAT

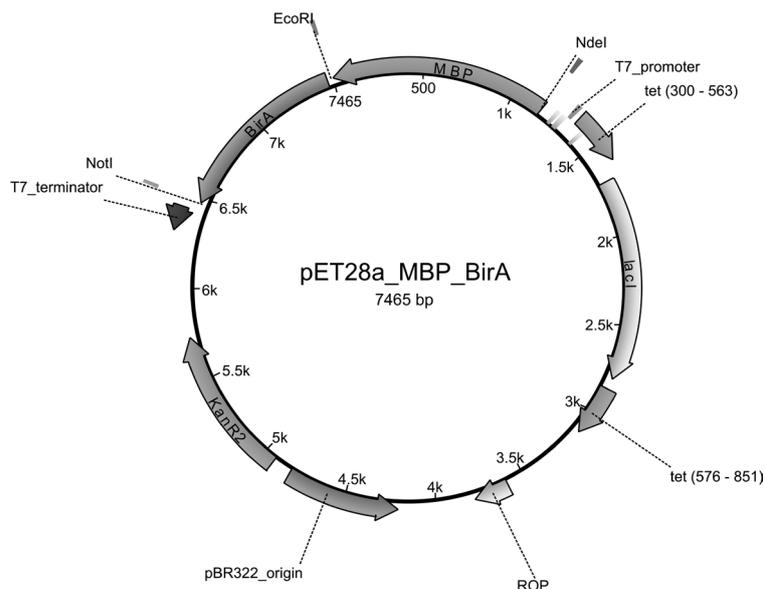


Рис. 2. Карта вектора для экспрессии сшитого белка MBP-BirA

Fig. 2. Expression vector coding MBP-BirA fusion protein

(обратный праймер, несущий сайт рестрикции *NotI*). Вектор, полученный на предыдущем этапе, был подвергнут рестрикции по соответствующим сайтам и в него лигирован ПЦР-продукт.

Правильность последовательности полученной конструкции подтверждена секвенированием. Схематическое представление экспрессионного вектора показано на рис. 2.

Экспрессия, выделение и очистка рекомбинантной (*rBirA*) биотин лигазы. Ночную культуру клеток (5 мл) *E. coli* (штамм BL21 (DE3)) трансформировали плазмидной ДНК pET28a_MBP-BirA в 0,5 л LB-среды, содержащей канамицин (50 мкг/мл). Культуру клеток инкубировали в орбитальном термостатируемом шейкере при 28 °С и интенсивности перемешивания 250 об/мин до достижения оптического поглощения ~0,6 ОЕ при длине волны 600 нм, после чего добавляли индуктор синтеза белка ИПТГ (1 мМ). Экспрессию проводили при 18 °С в течение 24 ч, затем культуру охлаждали в течение 1 ч при 4 °С. Клетки собирали центрифугированием при 4500 g в течение 20 мин. Клетки, полученные из 1 л инкубационной среды, ресуспендировались (масса/объем = 1/4) в буфере А: 25 мМ Tris-HCl буфер (pH 8,0), содержащем 0,2 М NaCl, 0,5 мМ ФМСФ, 20% глицерин, и хранили при -75°С. Все последующие стадии выделения и очистки осуществлялись при 4 °С.

После разрушения бактериальных клеток супернатант предварительно пропускали через колонку с DEAE-целлюлозой (2,5×5,0 см), а элюат затем наносили на уравновешенную 5 объемами буфера А колонку с Ni-NTA агарозой (1,5×10 см). Колонку затем промывали 10 объемами буфера А, содержащего 50 мМ имидазол. Сшитый белковый комплекс MBP-BirA элюировали с колонки буфером А, содержащим 400 мМ имидазол. Препарат очищали от имидазола диализом против буфера Б (25 мМ Tris-HCl буфер (pH 8,0), содержащий 0,2 М NaCl).

BirA высвобождали из комплекса с MBP высокоспецифичным протеолизом с помощью TEV протеазы в массовом соотношении 100:1 (т. е. на 1 мг комплекса использовалось 10 мкг TEV протеазы). Реакцию протеолиза проводили 16 ч при комнатной температуре, после чего реакционную смесь вновь наносили на колонку с Ni-NTA агарозой. Не связавшуюся с сорбентом фракцию собирали и хранили при -20°С в 50 %-ном глицерине.

Конструирование экспрессионного вектора TXAS_avi. Для получения экспрессионного вектора для *in vivo/in vitro* биотинилирования pCWOri+_TXAS_avi в имеющийся вектор pCWOri+_TXAS в C'-концевую последовательность дополнительно вводили синтетическую генетическую конструкцию («Integrated DNA Technologies», США), кодирующую аминокислотную последовательность, содержащую подвижный линкер, Avi-tag, сайт узнавания для TEV протеазы, декаги-

Рис. 3. Схема синтетической конструкции для *in vivo/in vitro* биотинилированияFig. 3. Synthetic construct for *in vivo / in vitro* biotinylation

стидиновый таг и сайты узнавания для рестриктаз *Sall* и *HindIII* на 5' и 3' фланкирующих регионах соответственно (рис. 3).

Конструкция была аденилирована Taq полимеразой и клонирована (ТА-метод) в линейризованный по сайтам рестрикции *XcmI* высококопийный вектор для клонирования pXcmkn12. Полученную плазмиду использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* DH5a.

После наработки плазмидной ДНК в клетках, выделения промежуточного вектора и его линейризации по сайтам рестрикции *Sall* и *HindIII* конструкция длиной 127 п.о. была клонирована в линейризованный по тем же сайтам рестрикции экспрессионный вектор pCWori+, содержащий кДНК тромбоксан синтазы. Наличие модификации C'-концевой последовательности было подтверждено секвенированием.

Последующая экспрессия, выделение и очистка рекомбинантной тромбоксан синтазы (TXAS, CYP5A1) осуществлялась по методике, описанной ранее [23].

Твердофазный синтез пептида synth_avi_pept (ENLYFQSHHHHHHHHGLNDIFEAQKIEWH-CONH₂). Синтез проводили на автоматическом пептидном синтезаторе ResPepSL («INTAVIS Bioanalytical Instruments», Германия). В качестве твердофазного носителя использовали смолу Rink amide. В качестве активатора карбоксильной группы аминокислот использовали HBTU, а в качестве растворителя – диметилформамид. Для синтеза подобрали оптимизированный набор аминокислот для использования ортогональной схемы защитных групп. При такой схеме защиты используется основнотлабильная защитная группа FMOC для защиты α-NH₂ группы растущей цепи и кислотолабильные защитные группы для остальных функциональных групп аминокислот. Сама программа синтеза состояла из 31 цикла, каждый из которых включал:

- снятие Fmoc защитных групп при помощи 20%-ного раствора пиперидина;
- активацию и присоединение аминокислоты к растущей цепи;
- блокировку непрореагировавших пептидных цепей для снижения образования побочных продуктов и промывку растворителем;
- на последнем цикле использовалась тройная промывка дихлорметаном для удаления диметилформамида.

Для снятия пептида с твердофазного носителя и снятия кислотолабильных защитных групп использовали 95%-ный раствор трифторуксусной кислоты с добавлением протекторов свободнорадикальных процессов: 2,5% триизопропилсилана и 2,5% H₂O. Для осаждения пептида использовали охлажденный метилтретбутиловый эфир. Остатки эфира убирали последующей лиофилизацией в течение 24 ч в лиофильной сушке Labconco Freezone 12 («Labconco», США).

Аналитические методы. Концентрацию высокоочищенного препарата BirA определяли из абсолютного спектра поглощения, используя расчетный коэффициент молярной экстинкции $\epsilon_{280} = 47,440 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Спектрофотометрические исследования проводились на Cary 5000 UV-Vis-NIR («Agilent Technologies», США) и NanoDrop 2000 («Thermo Scientific», США).

Гомогенность препарата рекомбинантной BirA оценивали с помощью SDS-PAGE электрофореза с использованием прибора Mighty Small 2 SE250 («Hofer», США), а соответствие молекулярной массы ожидаемой, с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии на Microflex LRF («Bruker Daltonics», Германия).

Для анализа при помощи вестерн-блоттинга препараты белка после электрофореза переносили на PVDF-мембрану с помощью системы для электропереноса TurboBlot («BioRad», США). Мембрану инкубировали со стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена. Для окрашивания мембраны использовали хромогенный субстрат TMB – результаты регистрировали с помощью видеосистемы Gel Imager 2 («Vilber Lourmat», Франция).

Для анализа иммобилизованных на Ni-NTA магнитных частицах молекул, подвергшихся биотинилированию, реакцию смеси экстрагировали на SampliQ C18 Endcapped («Agilent», США) картриджах. Экстракты в дальнейшем анализировались на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex LRF с использованием Protein Calibration Standard II №8207234 и Peptide Calibration Standard II №8222570, («Bruker Daltonics», Германия).

Результаты и их обсуждение

Выделение и очистка rBirA. Для получения достаточного количества рекомбинантного белка (не менее 6 мг из 1 л культуральной среды) использовали гетерологическую экспрессию в клетках *E. coli* BL21(DE3) дефицитных по OmpT и Lon протеазам для снижения уровня неспецифического протеолиза. Для повышения выхода растворимого белка мы применяли подход, заключающийся в «шивании» целевого белка с мальтозу-связывающим белком (MBP) *E. coli*. Сшитый белок за счет наличия на N'-концевой последовательности MBP полигистидиновой метки очищали с помощью металл-аффинной хроматографии на Ni-NTA сорбенте и затем подвергали высокоспецифичному протеолизу по сайту узнавания для TEV протеазы. В результате высвобождался целевой белок, смесь снова наносили на Ni-NTA агарозу и собирали фракции, не связавшиеся с сорбентом и, следовательно, содержащие rBirA. Это стало возможно за счет размещения полигистидинового кластера в N'-концевой последовательности MBP.

Препарат белка массой 35,247 кДа (по данным MALDI-TOF масс-спектрометрии), что соответствует теоретической расчетной массе ($MW = 35,312$ кДа) получен в гомогенном состоянии без следов неспецифической протеолитической деградации. Исходя из полученных данных следует, что чистота белкового препарата составила более 95% (рис. 4).

Реконструкция ферментативной активности. Для доказательства наличия специфической ферментативной активности rBirA в качестве субстрата использовали рекомбинантную TXAS_avi, несущую Avi-tag в C-концевой последовательности.

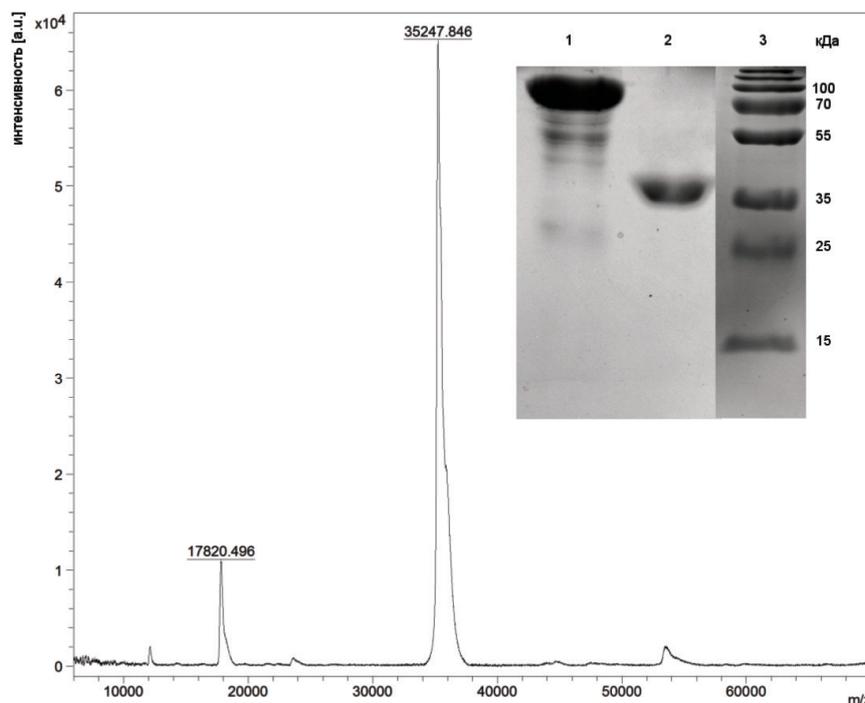


Рис. 4. MALDI-TOF масс-спектр полученного белкового препарата BirA. На врезке – результат SDS-PAGE электрофореза rBirA в 15%-ном геле: 1 – сшитый белковый комплекс MBP-BirA после очистки на NiNTA агарозе; 2 – очищенный белковый препарат rBirA; 3 – стандарт молекулярных масс («Pierce», #26620)

Fig. 4. MALDI-TOF mass spectrum of the recombinant BirA. Inset shows SDS-PAGE electrophoresis in 15% gel: 1 – MBP-BirA fusion protein after NiNTA agarose purification; 2 – purified rBirA enzyme; 3 – molecular weight standard («Pierce», #26620)

Активность биотин лигазы реконструировали в 25 мМ Tris-HCl буфере (pH 8,0), содержащем 50 мкМ D-биотина, 5 мМ АТФ, 40 мкМ субстрата. Количество гBirA составляло 5 мкг на каждые 10 нмоль субстрата. Реакцию осуществляли при 4 °С в течение 16 ч. Эффективность биотинилирования оценивали с помощью вестерн-блоттинга. Результат вестерн-блоттинга свидетельствует, что продукт реакции биотинилирования тромбоксан синтазы способен связывать стрептавидин (рис. 5).

Реконструкция ферментативной активности в условиях иммобилизации субстрата на магнитных частицах. Для оценки влияния иммобилизации пептидов и белков на микрочастицах на эффективность биотинилирования был получен синтетический пептид synth_avi_rept с массой 4081 Да, содержащий Avi-tag, декагистициновую метку и сайт узнавания для TEV протеазы. Кроме того, биотинилированию также подвергался препарат тромбоксан синтазы (TXAS_avi), содержащий в первичной последовательности аналогичный пептид. Пептид и белок подвергались иммобилизации на Millipore PureProteome Ni-NTA магнитных микрочастицах в PBS буфере за счет наличия полигистициновых кластеров.

Активность гBirA реконструировали в 25 мМ Tris-HCl буфере (pH 8,0), содержащем 50 мкМ D-биотина, 5 мМ АТФ, 40 мкМ субстрата. Количество гBirA составляло 5 мкг на каждые 10 нМ субстрата. Реакцию осуществляли при 4 °С в течение 16 ч. Затем в случае пептидного субстрата производили элюцию с магнитных частиц с помощью PBS буфера, содержащего 500 мМ имидазола. Эффективность биотинилирования оценивали с помощью анализа MALDI-TOF масс-спектров (рис. 6, а).

В случае биотинилирования TXAS вводили дополнительную стадию высокоспецифичного протеолиза с помощью TEV протеазы, что позволило в конечном итоге получить иммобилизованные на магнитных микрочастицах C'-концевые пептиды белка, содержащие Avi-tag с биотинилированным остатком лизина (txas_avi_rept). Затем аналогично описанному выше производили элюцию с магнитных частиц с помощью PBS буфера, содержащего 500 мМ имидазола. Эффективность биотинилирования оценивали с помощью анализа MALDI-TOF масс-спектров (рис. 6, б).

В результате проведенной реакции *in vitro* биотинилирования был получен гомогенный (чистота составила более 95%) биотинилированный синтетический пептид с массой 4307,065 Да (что соответствует теоретической расчетной массе MW = 4307,620 Да). Стоит отметить, что реакция биотинилирования в идентичных условиях в растворе протекала менее эффективно (данные не представлены). Этот факт указывает на то, что иммобилизация на магнитных частицах не только не мешает ходу реакции биотинилирования, но и к тому же повышает выход биотинилированного продукта. Это может быть объяснено определенной благоприятной ориентацией в пространстве и снижением степени олигомеризации такого пептида по сравнению с пептидом, находящиеся в растворе.

В случае продукта протеолиза TXAS_avi (аминокислотная последовательность – SHNNNNNNNNHGLNDIFEAQKIEWNE) массой 3286,492 Да произошло полное превращение в пептид массой 3512,600 Да, что соответствует теоретической расчетной массе 3512,802 Да.

Мы можем предположить, что вышеописанный подход найдет широкое применение в приложениях получения конъюгатов рекомбинантных белков, так как он совмещает в себе этапы очистки и биотинилирования целевой молекулы. Кроме того, возможно введение стадии высокоспецифичного протеолиза для отщепления внедренной последовательности после окончания выделения целевого белка. Принципиальная схема описанного подхода изложена на рис. 7.

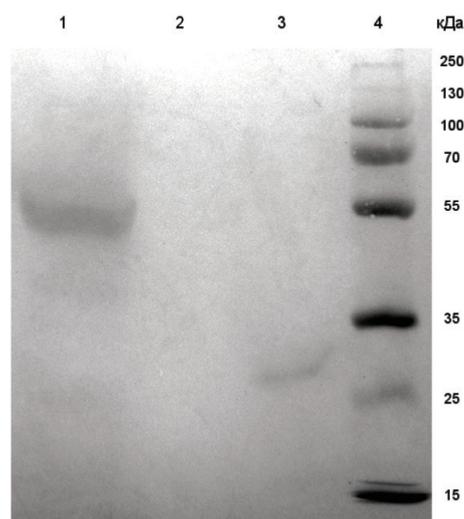


Рис. 5. Результат вестерн-блоттинга продукта реакции биотинилирования. 1 – TXAS_avi, 2 – TXAS, 3 – положительный контроль (~27 кДа), 4 – стандарт молекулярных масс («Pierce», #26620)

Fig. 5. Western blotting of the biotinylation reaction product. 1 – TXAS_avi, 2 – TXAS, 3 – positive control (~27 kDa), 4 – molecular weight standard («Pierce», #26620)

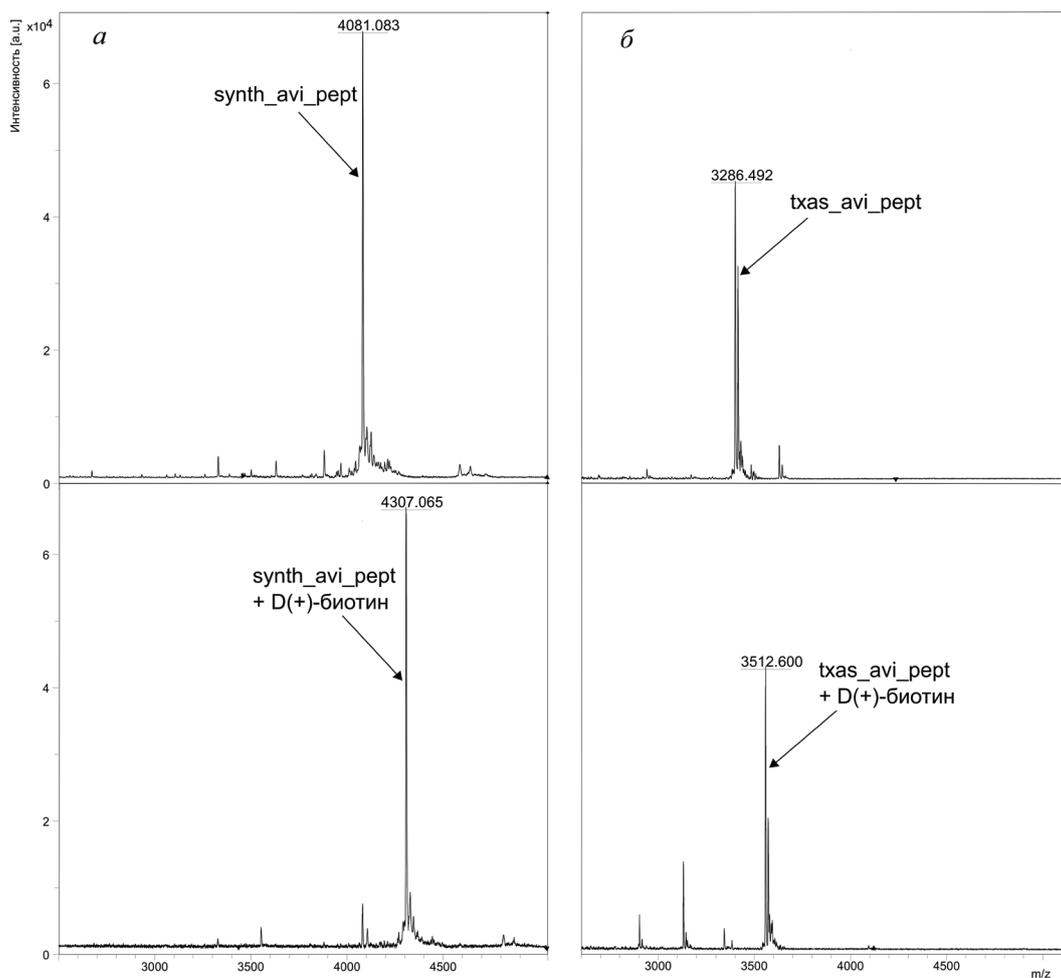


Рис. 6. MALDI-TOF масс-спектры исследуемых пептидов. *a* – синтетический пептид, *б* – (*l*) продукт протеолиза TXAS, содержащий Avi-tag

Fig. 6. MALDI-TOF mass spectra of the investigated peptides. *a* – synthetic peptide, *б* – product of TXAS proteolysis containing Avi-tag

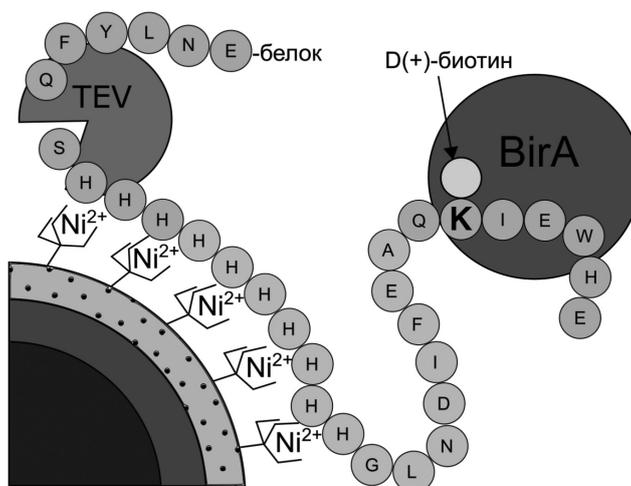


Рис. 7. Схема реакции биотинилирования белковых молекул аффинно иммобилизованных на магнитных микрочастицах

Fig. 7. Biotinylation reaction of the protein molecules immobilized on affine magnetic beads

Таким образом, в результате проведенной работы разработан метод получения в растворимой форме активной rBirA с целью ее последующего применения для специфичного *in vitro* биотинилирования белковых комплексов, имеющих в своем составе Avi-tag, и описан подход к сайт-специфичному *in vitro* биотинилированию мишеней пептидной и белковой природы, аффинно иммобилизованных на магнитных микрочастицах. Биотинилирование белков стало возможным за счет конструирования универсального экспрессионного вектора, несущего полигистидиновый кластер, Avi-tag и сайт узнавания для TEV протеазы.

Выводы. В результате нами проведено молекулярное клонирование, экспрессия, выделение в высокоочищенном состоянии рекомбинантной биотин лигазы *E. coli* (rBirA), а также доказана ее специфическая ферментативная активность по отношению к белкам и пептидам, содержащим биотин-акцепторную последовательность, в том числе иммобилизованным на поверхности микрочастиц. Учитывая перспективность применения данного фермента в биотехнологических задачах, а также возможность получения rBirA в препаративных количествах, можно предположить, что применение ферментативного *in vitro* биотинилирования при получении рекомбинантных белков получит широкое применение.

Использование универсального экспрессионного вектора и иммобилизации на магнитных частицах позволило разработать подход к эффективному ферментативному биотинилированию, совмещенному с очисткой целевых белковых молекул на аффинной матрице.

Благодарности. Работа выполнена при частичной поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант X16P-062 и X17M-012).

Acknowledgments. This work was partially supported by the Belarussian Foundation for Fundamental Research (grant X16P-062 and X17M-012).

Список использованных источников

1. Selective labeling of proteins with chemical probes in living cells / M. Z. Lin, L. Wang // *Physiology* (Bethesda). – 2008. – Vol. 23. – P. 131–141.
2. Avidin and streptavidin / N.M. Green // *Methods Enzymol.* – 1990. – Vol. 184 – P. 51–67.
3. Interaction of biotin with streptavidin. Thermostability and conformational changes upon binding / M. González [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272, № 17. – P. 11288–11294.
4. Genetic engineering of streptavidin, a versatile affinity tag / T. Sano, S. Vajda, C. R. Cantor // *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* – 1998. – Vol. 715, № 1. – P. 85–91.
5. A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site / M. Howarth [et al.] // *Nat. Methods.* – 2006. – Vol. 3, № 4. – P. 267–273.
6. A streptavidin variant with slower biotin dissociation and increased mechanostability / C.E. Chivers [et al.] // *Nat. Methods.* – 2010. – Vol. 7, № 5. – P. 391–393.
7. Designed Auto-assembly of Nanostreptabodies for Rapid Tissue-specific Targeting *in vivo* / P. Valadon [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285, № 1. – P. 713–722.
8. An artificial processivity clamp made with streptavidin facilitates oriented attachment of polymerase-DNA complexes to surfaces / J. G. K. Williams [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2008. – Vol. 36, № 18. – P. e121-e121.
9. Ideal, catch, and slip bonds in cadherin adhesion / S. Rakshit [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2012. – Vol. 109, № 46. – P. 18815–18820.
10. Cholesterol Loading and Ultrastable Protein Interactions Determine the Level of Tumor Marker Required for Optimal Isolation of Cancer Cells / J. Jain, G. Veggiani, M. Howarth // *Cancer Res.* – 2013. – Vol. 73, № 7. – P. 2310–2321.
11. A novel method for producing mono-biotinylated, biologically active neurotrophic factors: An essential reagent for single molecule study of axonal transport / K. Sung [et al.] // *J. Neurosci. Methods.* – 2011. – Vol. 200, № 2. – P. 121–128.
12. Site-directed immobilisation of antibody fragments for detection of C-reactive protein / I. Vikholm-Lundin, W.M. Albers // *Biosens. Bioelectron.* – 2006. – Vol. 21, № 7. – P. 1141–1148.
13. Biotinylation of proteins *in vivo*. A post-translational modification to label, purify, and study proteins / J. E. Cronan // *J. Biol. Chem.* – 1990. – Vol. 265, № 18. – P. 10327–33.
14. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation / D. Beckett, E. Kovaleva, P. J. Schatz // *Protein Sci.* – 1999. – Vol. 8. – P. 921–929.
15. Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice / E. de Boer [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2003. – Vol. 100, № 13. – P. 7480–7485.
16. Metabolic Biotinylation of Secreted and Cell Surface Proteins from Mammalian Cells / M.B. Parrott, M. A. Barry // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – Vol. 281, № 4 – P. 993–1000.
17. Targeting quantum dots to surface proteins in living cells with biotin ligase / M. Howarth [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2005. – Vol. 102, № 21. – P. 7583–7588.

18. In vivo biotinylation of the major histocompatibility complex (MHC) class II/peptide complex by coexpression of BirA enzyme for the generation of MHC class II/tetramers / J. Yang [et al.] // *Hum. Immunol.* – 2004. – Vol. 65, № 7. – P. 692–699.

19. A native chromatin purification system for epigenomic profiling in *Caenorhabditis elegans* / S.L. Ooi, J.G. Henikoff, S. Henikoff // *Nucleic Acids Res.* – 2010. – Vol. 38, № 4. – P. e26.

20. How the biotin–streptavidin interaction was made even stronger: investigation via crystallography and a chimaeric tetramer / C.E. Chivers [et al.] // *Biochem. J.* – 2011. – Vol. 435, № 1. – P. 55–63.

21. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques / C. Mateo [et al.] // *Enzyme Microb. Technol.* – 2007. – Vol. 40, № 6. – P. 1451–1463.

22. Молекулярное клонирование, гетерологическая экспрессия, выделение и очистка стабильной TEV протеазы / А. В. Свирид [и др.] // Прил. к журн. Вес. Нац. акад. наук Беларуси: материалы Междунар. науч. конф. «Молодежь в науке – 2015», Ч. 1. – Минск, 2016. – С. 69–73.

23. Пептидный фаговый дисплей в скрининге пептидомиметиков тромбоксан синтазы / Д. О. Дормешкин [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2015. – Т. 59, № 2. – С. 53–60.

References

1. Lin M. Z., Wang L., “Selective labeling of proteins with chemical probes in living cells”, *Physiology (Bethesda)*, 2008, vol. 23, pp. 131–141.

2. Green N. M., “Avidin and streptavidin”, *Methods in Enzymology*, 1990, vol. 184, pp. 51–67.

3. González M., Bagatolli L. A., Echabe I., Arrondo J. L., Argaraña C. E., Cantor C. R., Fidelio G. D., “Interaction of biotin with streptavidin. Thermostability and conformational changes upon binding”, *Journal of Biological Chemistry*, 1997, vol. 272, no. 17, pp. 11288–11294.

4. Sano T., Vajda S., Cantor C. R., “Genetic engineering of streptavidin, a versatile affinity tag”, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1998, vol. 715, no. 1, pp. 85–91.

5. Howarth M., Chinnapen D. J., Gerrow K., Dorresteijn P. C., Grandy M. R., Kelleher N. L., El-Husseini A., Ting A. Y., “A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site”, *Nature Methods*, 2006, vol. 3, no. 4, pp. 267–273.

6. Chivers C. E., Crozat E., Chu C., Moy V. T., Sherratt D. J., Howarth M., “A streptavidin variant with slower biotin dissociation and increased mechanostability”, *Nature Methods*, 2010, vol. 7, no. 5, pp. 391–393.

7. Valadon P., Darsow B., Buss T. N., Czarny M., Griffin N. M., Nguyen H. N., Oh P., Borgstrom P., Chrastina A., Schnitzer J. E., “Designed Auto-assembly of Nanostreptabodies for Rapid Tissue-specific Targeting in vivo”, *Journal of Biological Chemistry*, 2010, vol. 285, no. 1, pp. 713–722.

8. Williams J. G., Steffens D. L., Anderson J. P., Urlacher T. M., Lamb D. T., Grone D. L., Egelhoff J. C., “An artificial processivity clamp made with streptavidin facilitates oriented attachment of polymerase-DNA complexes to surfaces”, *Nucleic Acids Research*, 2008, vol. 36, no. 18, pp. e121–e121.

9. Rakshit S., Zhang Y., Manibog K., Shafriz O., Sivasankar S., “Ideal, catch, and slip bonds in cadherin adhesion”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, vol. 109, no. 46, pp. 18815–18820.

10. Jain J., Veggiani G., Howarth M., “Cholesterol Loading and Ultrastable Protein Interactions Determine the Level of Tumor Marker Required for Optimal Isolation of Cancer Cells”, *Cancer Research*, 2013, vol. 73, no. 7, pp. 2310–2321.

11. Sung K., Maloney M. T., Yang J., Wu C., “A novel method for producing mono-biotinylated, biologically active neurotrophic factors: An essential reagent for single molecule study of axonal transport”, *Journal of Neuroscience Methods*, 2011, vol. 200, no. 2, pp. 121–128.

12. Vikholm-Lundin I., Albers W. M., “Site-directed immobilisation of antibody fragments for detection of C-reactive protein”, *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, vol. 21, no. 7, pp. 1141–1148.

13. Cronan J. E., “Biotinylation of proteins in vivo. A post-translational modification to label, purify, and study proteins”, *Journal of Biological Chemistry*, 1990, vol. 265, no. 18, pp. 10327–10333.

14. Beckett D., Kovaleva E., Schatz P. J., “A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation”, *Protein Science*, 1999, vol. 8, pp. 921–929.

15. de Boer E., Rodriguez P., Bonte E., Krijgsveld J., Katsantoni E., Heck A., Grosveld F., Strouboulis J., “Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, vol. 100, no. 13, pp. 7480–7485.

16. Parrott M. B., Barry M. A., “Metabolic Biotinylation of Secreted and Cell Surface Proteins from Mammalian Cells”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, vol. 281, no. 4, pp. 993–1000.

17. Howarth M., Takao K., Hayashi Y., Ting A. Y., “Targeting quantum dots to surface proteins in living cells with biotin ligase”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, vol. 102, no. 21, pp. 7583–7588.

18. Yang J., Jaramillo A., Shi R., Kwok W. W., Mohanakumar T., “In vivo biotinylation of the major histocompatibility complex (MHC) class II/peptide complex by coexpression of BirA enzyme for the generation of MHC class II/tetramers”, *Human Immunology*, 2004, vol. 65, no. 7, pp. 692–699.

19. Ooi S. L., Henikoff J. G., Henikoff S., “A native chromatin purification system for epigenomic profiling in *Caenorhabditis elegans*”, *Nucleic Acids Research*, 2010, vol. 38, no. 4, p. e26.

20. Chivers C. E., Koner A. L., Lowe E. D., Howarth M., “How the biotin–streptavidin interaction was made even stronger: investigation via crystallography and a chimaeric tetramer”, *Biochemical Journal*, 2011, vol. 435, no. 1, pp. 55–63.

21. Mateo C., Palomo J. M., Fernandez-Lorente G., Guisan J. M., Fernandez-Lafuente R., “Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques”, *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, vol. 40, no. 6, pp. 1451–1463.

22. Svirid A. V., Dormeshkin D. O., Gilep A. A., Usanov S. A., “Molecular cloning, heterologous expression, isolation and purification of stable TEV protease”, *Prilozhenie k zhurnalu Izvestiia Natsional'noi akademii nauk Belarusi s materialami Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii «Molodezh' v nauke – 2015», 1 chast', 2015* [Supplement to the journal *Izvestiya of the National Academy of Sciences of Belarus with the materials of the International Scientific Conference “Youth in Science 2015”*, part 1, 2015], Minsk, BY, 2016, pp. 69–73.

23. Dormeshkin D. O., Svirid A. V., Gilep A. A., Usanov S. A., “Peptide phage display in the screening of peptidomimetics of thromboxane synthase”, *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2015, vol. 59, no. 2, pp. 53–60.

Информация об авторах

Свирид Андрей Васильевич – науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Акад. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: svirid.andrei@gmail.com.

Луцник Александр Яковлевич – науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Акад. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sasha_1_88@mail.ru.

Гилеп Андрей Александрович – канд. хим. наук, зав. отделом, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Акад. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: agilep@iboch.bas-net.by.

Усанов Сергей Александрович – член-корр., д-р хим. наук, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Акад. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: usanov@iboch.bas-net.by.

Information about the authors

Andrei V. Svirid – Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: svirid.andrei@gmail.com.

Aliaksandr Ya. Lushchik – Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sasha_1_88@mail.ru.

Andrei A. Gilep – Ph. D. (Chemistry), Head of the Department, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: agilep@iboch.bas-net.by.

Sergei A. Usanov – Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, D. Sc. (Chemistry), Professor, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: usanov@iboch.bas-net.by.