

РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЕРОКСИДАЗА ХРЕНА: ПОЛУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В АНАЛИТИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ

Обзор

© 2015 В.Г. Григоренко^{1*}, И.П. Андреева¹,
М.Ю. Рубцова¹, А.М. Егоров^{1,2}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119991 Москва; факс: +7(495)939-2742,
электронная почта: vitaly.grigorenko@gmail.com

² Российская медицинская академия постдипломного образования,
кафедра микробиологии, 125993 Москва

Поступила в редакцию 14.11.14
После доработки 09.12.14

Пероксидаза хрена – важный фермент в био- и иммунохимическом анализе. Новые подходы к функциональной экспрессии гена пероксидазы в клетках *Escherichia coli* и последующему рефолдингу дали возможность получать рекомбинантный фермент, сравнимый по своим спектральным и каталитическим характеристикам с нативной растительной пероксидазой. Генно-инженерные подходы открыли новые перспективы в получении рекомбинантных конъюгатов пероксидазы как с антигенами, так и с Fab-фрагментами антител. Настоящий обзор посвящен использованию рекомбинантной пероксидазы хрена в качестве фермента-маркера в иммуноферментном анализе, а также в амперометрических сенсорах, основанных на прямом переносе электронов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пероксидаза хрена, рекомбинантный конъюгат, амперометрический биосенсор.

Изофермент С пероксидазы хрена (ПХ, КФ 1.11.1.7) – широко распространенный в растениях, гем- и Са²⁺-содержащий фермент, является представителем семейства растительных пероксидаз [1–3], которые катализируют одноэлектронное окисление различных органических и неорганических субстратов пероксидом водорода. Растительные пероксидазы нашли применение в различных биотехнологических процессах, таких как биоотбеливание, утилизация органических соединений (фенолы, красители, лигнин), образующихся в ряде производств и др., тогда как пероксидаза хрена широко используется в аналитической биохимии и биотехнологии в качестве фермента-маркера для иммунохимического определения антител, ДНК и низкомолекулярных соединений. Благодаря широкой субстратной специфичности, высокой

каталитической активности и стабильности, ПХ нашла огромное применение в био- и иммуносенсорах, хемилюминесцентной, флуоресцентной и электрохимической системах детекции, в ДНК- и белковых микрочипах с колориметрической детекцией [4–8].

Успехи в гетерологической экспрессии гена пероксидазы и установление кристаллической структуры ПХ открыли новые возможности для изучения структурно-функциональных закономерностей с помощью методов генной инженерии. Главной проблемой при экспрессии этого белка является его сложная структура: это гликопротеин, содержащий в активном центре гем. Существует несколько способов экспрессии гена ПХ. Так, система экспрессии в бакуловирусах позволила получать рекомбинантный фермент в растворимой активной и гликозилированной форме [9]. Однако эта система из-за трудоемкости, сложности и дороговизны не нашла столь широкого распространения по сравнению с экспрессией в клетках *E. coli*. Экспрессия ПХ в дрожжах позволила получать фермент в активной растворимой форме, но с очень низким выходом [10].

Принятые сокращения: ПХ – пероксидаза хрена; рПХ – рекомбинантная ПХ; ЭП – электронный перенос; ЛО – L-лизин- α -оксидаза; БСЖК – белок, связывающий жирные кислоты; ИФА – иммуноферментный анализ; ОИМ – острый инфаркт миокарда.

* Адресат для корреспонденции.

Для получения рекомбинантной ПХ (рПХ) дикого типа, а также ее мутантных форм в основном используется система экспрессии в клетках *E. coli* [11, 12]. Рекомбинантная ПХ синтезируется в цитоплазме клеток *E. coli* в нерастворимой, неактивной форме в телах включения и содержит только следовые количества гема. Процесс рефолдинга и реактивации апопероксидазы простетической группой гема является сложной многоступенчатой задачей, поскольку молекула белка содержит четыре дисульфидные связи и два Ca^{2+} -иона. Кроме того, растительный фермент содержит 8 сайтов гликозилирования (18% углеводов по массе). Ранее была установлена кристаллическая структура рПХ и было показано, что молекула белка состоит из двух доменов, состоящих в общей сложности из десяти α -спиралей [13].

Одним из факторов, приводящих к образованию тел включения в случае гетерологической экспрессии рекомбинантных белков с дисульфидными связями в клетках *E. coli*, является наличие активной системы поддержания восстанавливающего потенциала цитоплазмы, что препятствует правильному образованию дисульфидных связей и формированию нативной конформации таких белков [14]. В качестве альтернативного подхода для получения рекомбинантного белка в растворимой активной форме был выбран метод экспрессии в бактериальную периплазму, где окислительный потенциал способствует формированию стабильных дисульфидных связей. Для этой цели был создан экспрессионный вектор, кодирующий ПХ и сигнальный пептид на *N*-конце. После транслокации сигнальный пептид удаляется, и образуется правильно сформированная молекула целевого белка с дисульфидными связями. Этот подход был успешно использован для получения растворимого активного рекомбинантного фермента рПХ, но с довольно низким выходом (~0,5 мг на 1 л культуры клеток *E. coli*) [15].

Для аналитического применения рПХ, например, в биосенсорах, необходим более эффективный и технологичный способ получения рекомбинантного фермента. Введение гексагистидиновой последовательности ($6 \times \text{His}$) в *C*-концевую область ПХ дало возможность проводить выделение фермента с помощью металлохелатной хроматографии и значительно облегчить процессы реактивации и очистки рПХ из тел включения. Кроме того, в три раза увеличивается выход рекомбинантного препарата, в частности, за счет эффективного выделения рПХ из сильно разбавленных растворов среды для рефолдинга [15]. Сравнительно высокий выход и высокая удельная активность рекомбинантного

фермента, полученного с использованием разработанного протокола рефолдинга, позволили получать достаточное количество рекомбинантного фермента (~10 мг из 1 л культуры клеток) для разработки биосенсоров, основанных на прямом переносе электронов (ЭП) с электрода на иммобилизованную рекомбинантную ПХ [4, 6], а также для улучшения чувствительности сенсоров, основанных на реакции усиленной хемилюминесценции [7].

БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФОРМ ПХ

Пероксидаза, иммобилизованная на электроде и способная участвовать в прямом ЭП, позволяет создать безмедиаторный биосенсор для определения как пероксидов, так и многих органических соединений, дающих пероксиды при окислении соответствующими оксидазами (глюкозооксидазой, лизин-оксидазой и др.). Однако в отсутствие медиатора эффективность прямого ЭП в системе золотой электрод-ПХ чрезвычайно низка [4, 5]. Наиболее вероятной причиной этого является большое расстояние между поверхностью электрода и активным центром ПХ из-за того, что растительный фермент гликозилирован и/или из-за неоптимальной ориентации молекулы на поверхности электрода. Также одной из основных проблем является прочность адсорбции белковой молекулы на поверхности золотого электрода. Метод ковалентной иммобилизации посредством специальных химических сшивок приводит к увеличению расстояния между активным центром фермента и электродом, затрудняя прямой ЭП. Известные в настоящий момент способы иммобилизации биомолекул, приводящие к ЭП, сводятся к прочной хемосорбции ряда функциональных групп на поверхности золота [4, 5].

Методы генной инженерии позволили получить рекомбинантную ПХ и направленно изменять поверхность молекулы ПХ путем введения аминокислотных остатков (цистеина, гистидина), содержащих «удобные» функциональные группы для осуществления ориентированной иммобилизации фермента [15]. Золотые электроды, модифицированные рекомбинантными формами ПХ, проявляли высокий и стабильный амперометрический отклик в реакции биокаталитического восстановления пероксида водорода вследствие прямого электронного переноса между ПХ и электродом и являлись перспективными для разработки биосенсоров безмедиаторного типа [6].

Сочетание рПХ с *L*-лизин- α -оксидазой (ЛО), которая обладает большой каталитической ак-

тивностью в реакции восстановления пероксида водорода, позволило разработать безмедиаторный биферментный биосенсор на L-лизин, который может работать при умеренных значениях потенциала (от 0 до -50 мВ) в том случае, если прямой ЭП между поверхностью электрода и активным центром фермента может быть осуществлен (рис. 1). В этом случае концентрация L-лизина пропорциональна концентрации пероксида водорода, который выделяется в процессе его ферментативного окисления. Был разработан амперометрический биферментный биосенсор для определения L-лизина, основанный на ЛО (класс оксидоредуктаз, КФ 1.4.3.14, из *Trichoderma viride*) и рПХ с $6 \times \text{His}$ на C-конце (C_{His} рПХ), физически соиммобилизованных на поверхности золотых поликристаллических электродов. Эффективный прямой ЭП между поверхностью золотого электрода и иммобилизованной рекомбинантной ПХ позволил осуществить безмедиаторное определение пероксида водорода, образующегося в результате ферментативного окисления L-лизина в режиме остановленного потока (рис. 2). Предел обнаружения L-лизина составил 1 мкМ, чувствительность определения $-0,03 \text{ А см}^{-2} \text{ М}^{-1}$ при -50 мВ относительно хлорсеребряного электрода сравнения [4–6].

РЕКОМБИНАНТНЫЕ КОНЬЮГАТЫ В АНАЛИЗЕ

Пероксидаза хрена – один из наиболее широко применяемых ферментов-маркеров в иммунодиагностике. Для высокочувствительных

методов иммуноферментного анализа (ИФА) необходимы конъюгаты ферментов-маркеров с антигенами или антителами. Однако все химические методы получения конъюгатов, как правило, приводят к частичной инактивации фермента и гетерогенности конъюгатов, что оказывает влияние на воспроизводимость, специфичность и чувствительность анализа. С развитием генной инженерии появилась возможность получать рекомбинантные конъюгаты с белковыми антигенами или антителами, представляющие собой химерные белки, в которых объединены структурные части как фермента-маркера, так и антигена/антитела. Такие конъюгаты обладают рядом преимуществ по сравнению с химически полученными, а именно, они гомогенны по составу, имеют стехиометрию $1 : 1$, воспроизводимы и сохраняют функциональную активность как белка-маркера, так и антигена/антитела [16, 17].

Рекомбинантные конъюгаты белковых антигенов были получены с бактериальными ферментами – β -галактозидазой [18–19, 20] и щелочной фосфатазой [21–23], которые могут быть экспрессированы в растворимой форме в клетках *E. coli*, а также с биолюминесцентными и флуоресцентными белками-маркерами, такими как акварин (*Aequorea victoria*) и зеленый флуоресцентный белок [24, 25]. Был создан ряд рекомбинантных конъюгатов белка А с ферментами, в частности, с β -лактамазой [26] и люциферазой [27]. Кроме того, генно-инженерные подходы особенно привлекательны для небольших пептидов с многочисленными функциональными группами, которые трудно контролировать [28] или с человеческими белками, кото-

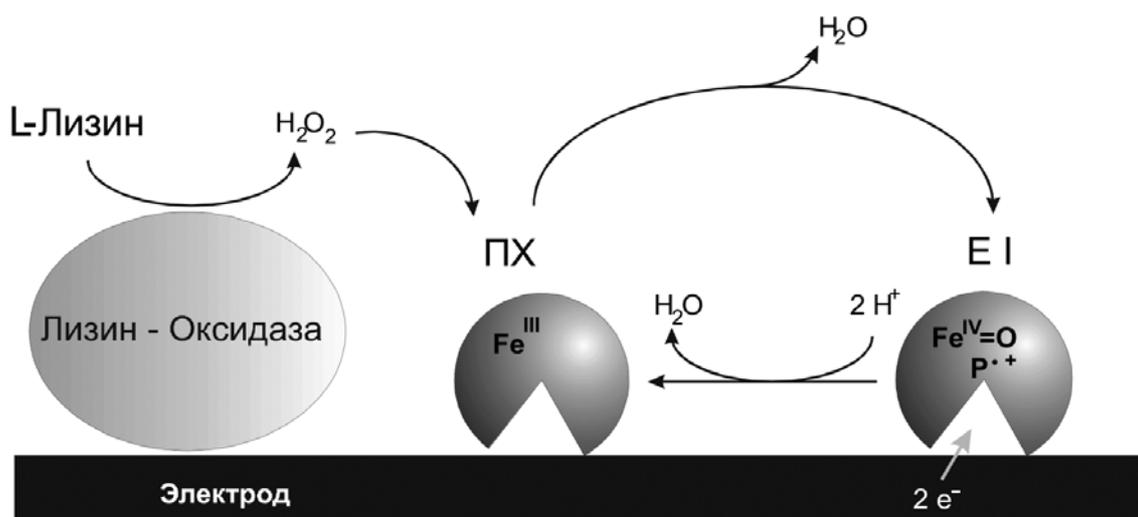


Рис. 1. Биферментный амперометрический сенсор на основе ПХ и ЛО

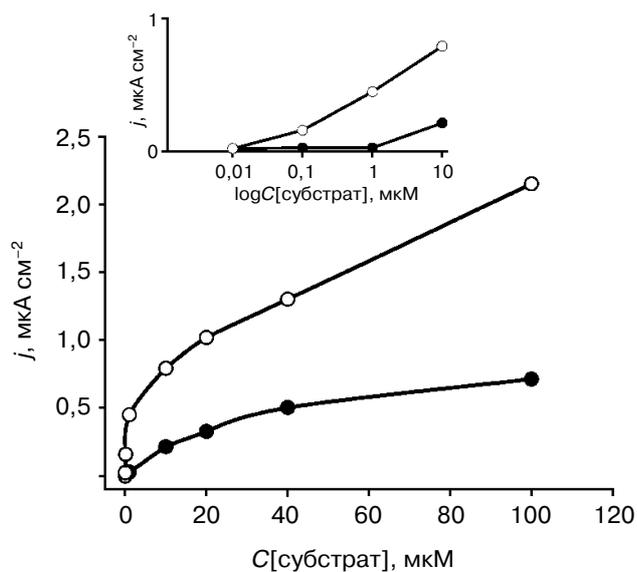


Рис. 2. Зависимость стационарной плотности тока от концентрации L-лизина (1) и H_2O_2 (2) в проточно-инжекционной системе для золотых электродов, модифицированных S_{His} ПХ, соадсорбированной с ЛО. Потенциал электрода: -50 мВ относительно Ag/AgCl в $0,1$ М KCl, скорость потока субстрата в ФСБР – 900 мкл/мин, pH $6,0$. Кривая 1 получена в режиме остановленного потока

рые часто трудно получать в большом количестве [29]. Рекombинантные конъюгаты антител с различными ферментами: щелочной фосфатазой [30–34], люциферазой [35], пероксидазой *Arthromyces ramosus* [36] также были получены.

В то время как β -галактозидаза экспрессируется в растворимой форме в цитоплазму, дисульфидсодержащая щелочная фосфатаза секретруется в периплазму [37, 38]. Недостатком бактериальной щелочной фосфатазы является более низкая удельная активность по сравнению со щелочной фосфатазой из поджелудочной железы телят, обычно используемой для получения конъюгатов химическим «сшиванием». Эта проблема может быть частично решена использованием более активных генно-инженерных мутантов бактериального фермента [39]. Основной проблемой, связанной с конъюгатами с β -галактозидазой и щелочной фосфатазой, является их тетрамерная и димерная структуры, соответственно, что приводит к существенному увеличению аффинности конъюгатов по сравнению со свободным антигеном. Это особенно нежелательно при разработке конкурентных схем иммуноферментного анализа.

С другой стороны, пероксидаза хрена, которая широко используется для получения конъюгатов [20], может быть экспрессирована в *E. coli*

только в форме тел включения [11, 12], что долгое время препятствовало использованию рекombинантного фермента в анализе. Достижения в гетерологической экспрессии гена ПХ в клетках *E. coli* и реактивации рекombинантной пероксидазы хрена, содержащей олигогистидиновую последовательность на C-конце [15], дали возможность получения рекombинантных конъюгатов с пероксидазой в качестве фермент-маркера и применения их в иммуноферментном анализе.

РЕКОМБИНАНТНЫЕ КОНЪЮГАТЫ БЕЛКОВЫХ АНТИГЕНОВ С ПХ

Рекombинантный конъюгат пероксидазы хрена был впервые получен с белковым антигеном – белком, связывающим жирные кислоты (БСЖК), – и использован в конкурентной схеме ИФА для его определения [40]. БСЖК – небольшой (~ 15 кДа) цитозольный белок, является представителем семейства внутриклеточных липид-связывающих белков, участвующих в метаболизме жирных кислот. Сердечный тип БСЖК в большом количестве содержится в сердечных мышцах ($0,56$ мг/г сердечной ткани) и иммунологически отличается от других типов БСЖК. Небольшие размеры белка обуславливают его быстрое высвобождение из поврежденных кардиомиоцитов в кровотоке. Это, а также хорошая тканеспецифичность в сравнении с миоглобином, делают БСЖК перспективным маркером для ранней диагностики острого инфаркта миокарда (ОИМ) [29, 41].

Для получения рекombинантного конъюгата ПХ с БСЖК (ПХ–БСЖК) был использован экспрессионный вектор pETHRP-FABPhis (рис. 3; см. цветную вклейку), в котором участок ДНК, кодирующий БСЖК, клонирован по сайту *Xma*III в соответствующей рамке считывания после кодонов ПХ и перед $6 \times His$ [15]. Рекombинантный конъюгат был экспрессирован в цитоплазму клеток *E. coli* в виде тел включения. Рефолдинг и реактивацию проводили по схеме, разработанной ранее для рекombинантной ПХ с $6 \times His$ на C-конце [15].

Полученный конъюгат ПХ–БСЖК имел максимум поглощения пика полосы $So_{9\alpha}$ при 403 нм, как и для рекombинантной и нативной ПХ, что свидетельствует о неизменности микроокружения Fe^{3+} (координация гемом, дистальным и проксимальным гистидинами). Эти данные позволили сделать вывод о том, что C-концевое «удлинение» ПХ белком (БСЖК) с массой 15 кДа не оказывало критического влияния на каталитическую активность конъюгата, которая

соответствовала значениям удельной активности растительной ПХ и рекомбинантной ПХ с $6 \times \text{His}$ на С-конце (~1000 ед/мг по субстрату АБТС) [13]. В то же время рекомбинантный конъюгат взаимодействовал как с моноклональными антителами в сэндвич-методе ИФА, так и с поликлональными антителами, специфичными к БСЖК, что свидетельствовало о сохранении структурной целостности антигенных детерминант молекулы БСЖК [29, 40].

Для определения концентрации БСЖК был предложен метод конкурентного твердофазного ИФА, на проведение которого требуется значительно меньше времени по сравнению с сэндвич-методами ИФА. Метод основан на конкуренции БСЖК из измеряемой пробы и БСЖК, меченного пероксидазой, за центры связывания специфичных к БСЖК антител, иммобилизованных на поверхности лунок полистиролового планшета. Для сравнения методом периодатного окисления олигосахаридов был синтезирован конъюгат растительной ПХ с БСЖК [42]. Типичные калибровочные кривые (рис. 4) демонстрируют широкий диапазон измеряемых концентраций БСЖК (1,5–500 нг/мл) и низкий предел обнаружения – 1,5 нг/мл образца (0,05 нг на лунку). Коэффициент вариации не превышал 8% [40]. Эти результаты согласуются с литературными данными для сэндвич-методов ИФА с использованием моноклональных антител (0,02–0,1 нг на лунку) [29, 41]. При более высоких концентрациях БСЖК лучше конкурирует с рекомбинантным конъюгатом, чем с химически полученным конъюгатом, за связывание с поликлональными антителами. Это можно объяснить присутствием в химически полученном конъюгате молекул ПХ, связанных с несколькими молекулами БСЖК, что приводит к более высокой аффинности вследствие мультисвязывания с иммобилизованными антителами. Таким образом, рекомбинантный конъюгат, имеющий гомогенный состав, стехиометрию 1 : 1 и удельную активность в два раза выше по сравнению с конъюгатом, полученным традиционным методом химического синтеза, имеет преимущества при использовании в конкурентной схеме ИФА.

Для тестирования разработанного метода был проведен анализ образцов плазмы крови, взятых от одного пациента с диагнозом ОИМ в течение 24 ч после госпитализации (рис. 5) [40]. Значения концентраций БСЖК, полученные конкурентным методом ИФА, показали хорошую корреляцию с данными, полученными в рамках проекта EUROCARDI с помощью сэндвич-метода ИФА и электрохимического иммуносенсора [29, 41].

Таким образом, впервые была показана возможность воспроизводимого получения рекомбинантного конъюгата белкового антигена с пероксидазой хрена в качестве фермента-маркера и использование его в конкурентном методе ИФА для определения клинически важного анализита – белка, связывающего жирные кислоты [40]. Такой подход открывает новые перспективы применения широко используемого фермента-маркера ПХ в конкурентных схемах ИФА с использованием генно-инженерных конъюгатов. Так, была разработана концепция получения рекомбинантного конъюгата ПХ и человеческого миоглобина, другого важного маркера для ранней диагностики ОИМ.

РЕКОМБИНАНТНЫЕ КОНЪЮГАТЫ Fab-ФРАГМЕНТОВ АНТИТЕЛ С ПХ

Функциональная экспрессия рекомбинантного конъюгата ПХ и фрагментов антител в *E. coli* сопряжена с рядом трудностей. В клетках *E. coli* отсутствует посттрансляционное гликозилирование белков, что приводит к низкой растворимости и агрегации полученного белка. Эта проблема может быть решена сменой экспрессионной системы. Например, было показано, что метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris* более подходят для экспрессии антител, в сравнении с системой *E. coli* [43, 44].

По отдельности ПХ [45] и фрагменты антител [46] – как в одноцепочечной форме scFv [47, 48], так и в форме Fab [49] – были успешно

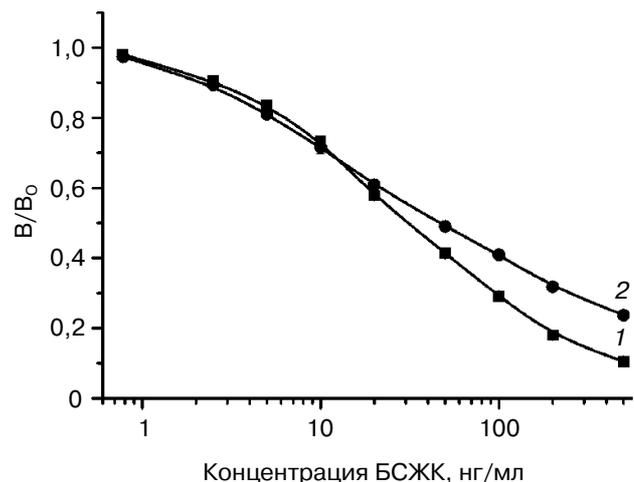


Рис. 4. Калибровочные кривые для определения БСЖК. 1 – Рекомбинантный конъюгат, 2 – химически полученный конъюгат

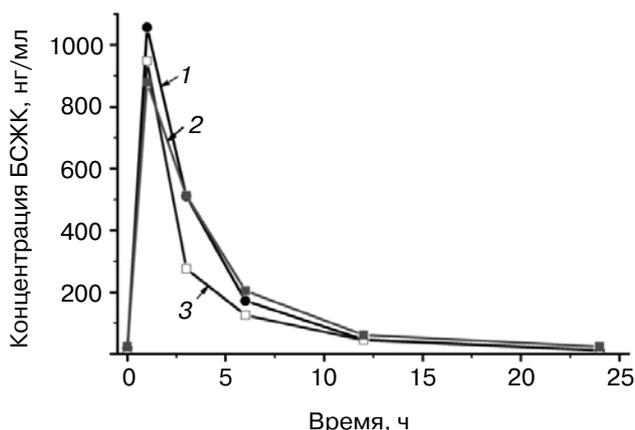


Рис. 5. Сравнительный анализ методов количественного определения БСЖК в плазме крови человека (профиль пациента № 14): 1 — сэндвич-метод ИФА, 2 — конкурентный метод ИФА, 3 — электрохимический иммуносенсор

экспрессированы в клетках *P. pastoris*. Более того, на основе данной экспрессионной системы были созданы иммуноконъюгаты: scFv с IgG-связывающим доменом белка А, с биотин-подобной пептидной последовательностью и с Fc-фрагментом IgG1 [50–52]. Также было показано, что экспрессия в системе *P. pastoris* в секретрируемой форме существенно упрощает масштабирование процесса для биотехнологических приложений [53].

Достижения в функциональной экспрессии ПХ и антител в секретрируемой форме в *P. pastoris* [45, 54] открывают путь к созданию рекомбинантных конъюгатов ПХ с антителами для использования в иммуноанализе. Однако получение рекомбинантных конъюгатов — задача довольно сложная и нетривиальная, поскольку невозможно достоверно предсказать структуру получаемого конъюгата, и, в результате, возможна потеря функциональной активности как фермента-маркера, так и антигена из-за неправильного фолдинга двух составных частей химерного белка.

Экспрессионная система для получения рекомбинантных конъюгатов ПХ с Fab-фрагментами антител была разработана на основе вектора pPICZαВ и клеток *P. pastoris* линии X33 («Invitrogen», США). Эти системы позволяют с помощью метанол-индуцибельной экспрессии в культуральную среду получать два вида конъюгатов, в которых пероксидазная часть генетически соединена короткой гибкой линкерной последовательностью $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ с N- или C-концом тяжелой цепи Fab-фрагмента (рис. 6; см. цветную вклейку) [55]. Следует отметить, что тяжелая цепь была выбрана для клонирования

маркерного белка во избежание образования нефункциональных димеров легкой цепи.

Полученный универсальный вектор pPIC-Fab содержал пары сайтов *SacI/XhoI* и *PstI/BstEII* для простого переклонирования генов тяжелой и легкой цепи, гексагистидиновый фрагмент на C-конце для упрощения очистки целевого белка с помощью металлохелатной хроматографии, а также сайт *NotI* для клонирования белка-маркера (такого как ПХ, зеленого флуоресцентного белка (EGFP), люциферазы и др.) на C-конце тяжелой цепи антитела.

Для изучения возможностей такого подхода впервые были получены рекомбинантные конъюгаты ПХ с Fab-фрагментами антител против атразина (рис. 6). Общий выход рекомбинантных конъюгатов составил около 3–10 мг на 1 л культурального супернатанта *P. pastoris*. Относительно низкий выход секреции конъюгатов в *P. pastoris* коррелировал с выходом при отдельной экспрессии гена ПХ [55]. Одним из факторов, отрицательно влияющих на выход, возможно, является избыточное гликозилирование пероксидазной части конъюгата, характерное для клеток *P. pastoris*. Для проверки этой гипотезы в дальнейшем может быть целесообразным удаление всех сайтов N-гликозилирования в гене ПХ, либо замена ПХ на другой репортерный белок, например, зеленый флуоресцентный белок.

Для подтверждения антиген-связывающей активности полученных рекомбинантных конъюгатов была выбрана схема непрямого конкурентного одностадийного ИФА атразина. Полученные данные подтвердили наличие как каталитической, так и антительной активности для всех вариантов конъюгатов. Однако низкая активность у образца ПХ-Fab в сравнении с C-концевым конъюгатом Fab-ПХ возможно свидетельствует о том, что взаимное пространственное расположение двух составных частей химерного белка в этом случае приводит к снижению каталитической активности пероксидазы.

Типичная калибровочная кривая (рис. 7) характеризовалась широким диапазоном определения концентрации атразина от 0,1 до 50 нг/мл, коэффициент вариации не превышал 8%. Величина IC_{50} составила 3 нг/мл, что хорошо согласуется с ранее полученными экспериментальными данными по определению атразина в двухстадийном ИФА с использованием рекомбинантных Fab-фрагментов того же антитела K411В [55], а также с данными по одноцепочечному мини-антителу (scFv), экспрессированному в *E. coli* [54, 56]. Таким образом, полученные в работе [55] рекомбинантные конъюгаты пероксидазы с Fab-фрагментами антитела против атразина являются функционально активными

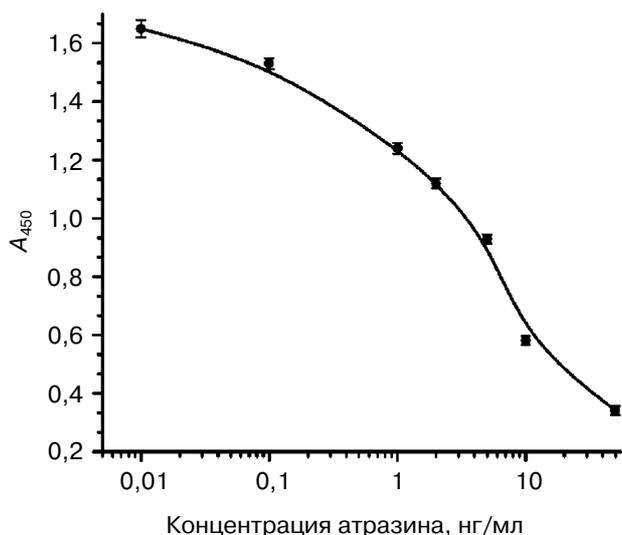


Рис. 7. Калибровочная кривая для определения атразина методом ИФА с рекомбинантным конъюгатом Fab-ПХ

и могут быть использованы для определения атразина методом ИФА.

Успехи в клонировании генов позволяют конструировать ферменты и конъюгаты на их основе с заданными свойствами методами направленного и случайного мутагенеза. Введение гексагистидиновой последовательности (6 × His) в С-концевую область ПХ позволило создать эффективную систему экспрессии гена ПХ в

клетках *E. coli*. Новая схема рефолдинга и реактивации рекомбинантной ПХ из тел включения позволила увеличить выход активного белка и существенно упростить весь процесс получения рекомбинантной ПХ.

Золотые электроды, модифицированные рекомбинантными формами ПХ, проявляют высокий и стабильный амперометрический сигнал биоэлектрокаталитического восстановления пероксида водорода вследствие эффективного прямого переноса электронов между поверхностью золота и активным центром фермента, что служит основой для создания универсального сенсора на H₂O₂, а также для создания биферментных сенсоров, основанных на соиммобилизации рПХ и соответствующих H₂O₂-образующих оксидаз (лизин-оксидазы, глюкоз-оксидазы и др.). Чувствительность золотых электродов, модифицированных рекомбинантными формами ПХ, была в 8–9 раз выше, чем для нативной ПХ.

Впервые была продемонстрирована возможность воспроизводимого получения рекомбинантных функционально-активных конъюгатов белковых антигенов и Fab-фрагментов антител с ПХ в качестве фермента-маркера для использования в иммуноферментном анализе. Полученные рекомбинантные конъюгаты обладали как иммунной, так и каталитической активностью.

Таким образом, применение современных методов белковой инженерии к пероксидазе хрена открывает новые возможности для разработки высокочувствительных иммунобиосенсоров нового поколения, основанных на рекомбинантной технологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chance, B. (1949) The enzyme-substrate compounds of horseradish peroxidase and peroxides; kinetics of formation and decomposition of the primary and secondary complexes, *Arch. Biochem.*, **22**, 224–252.
- Dunford, H.B., and Stillman, J.S. (1976) On the function and mechanism of action of peroxidases, *Coord. Chem. Rev.*, **19**, 187–251.
- Wielinder, K.G. (1979) Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase. Amino and carboxyl termini, cyanogen bromide and tryptic fragments, the complete sequence, and some structural characteristics of horseradish peroxidase C, *Eur. J. Biochem.*, **96**, 483–502.
- Ferapontova, E.E., Grigorenko, V.G., Egorov, A.M., Borchers, T., Ruzgas, T., and Gorton, L. (2001) Direct electron transfer in the system gold electrode-recombinant horseradish peroxidases, *J. Electroanal. Chem.*, **509**, 19–26.
- Ferapontova, E.E., Grigorenko, V.G., Egorov, A.M., Borchers, T., Ruzgas, T., and Gorton, L. (2001) Mediatorless biosensor for H₂O₂ based on recombinant forms of horseradish peroxidase directly adsorbed on polycrystalline gold, *Biosens. Bioelectron.*, **16**, 147–157.
- Presnova, G., Grigorenko, V., Egorov, A., Ruzdas, T., Lindgren, A., Gorton, L., and Borchers, T. (2000) Direct heterogeneous electron transfer of recombinant horseradish peroxidases on gold, *Faraday Discuss.*, **116**, 281–289.
- Rubtsova, M.Y., Kovba, G.V., and Egorov, A.M. (1998) Chemiluminescent biosensors based on porous supports with immobilized peroxidase, *Biosens. Bioelectron.*, **13**, 75–85.
- Rubtsova, M.Y., Ulyashova, M.M., Edelstein, M.V., and Egorov, A.M. (2010) Oligonucleotide microarrays with horseradish peroxidase-based detection for the identification of extended-spectrum β-lactamases, *Biosens. Bioelectron.*, **26**, 1252–1260.
- Hartmann, C., and Ortiz de Montellano, P.R. (1992) Baculovirus expression and characterization of catalytically active horseradish peroxidase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **297**, 61–72.
- Vlamis-Gardikas, A., Smith, A.T., Clements, J.M., and Burke, J.F. (1992) Expression of active horseradish peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. Soc. Trans.*, **20**, 111S.

11. Smith, A.T., Santana, N., Dacey, S., Edwards, M., Bray, R.C., Thorneley, R.N.F., and Burke, J.F. (1990) 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.*, **265**, 13335–13343.
12. Egorov, A.M., Gazaryan, I.G., Kim, B.B., Doseeva, V.V., Kapeliuch, J.L., Veryovkin, A.N., and Fechina, V.A. (1994) Horseradish peroxidase isozyme C. A comparative study of native and recombinant enzyme produced by *E. coli* transformants, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **721**, 73–82.
13. Gajhede, M., Schuller, D.J., Henriksen, A., Smith, A.T., and Poulos, T.L. (1997) Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution, *Nature Struct. Biol.*, **4**, 1032–1038.
14. Freedman, R.B. (1995) The formation of protein disulfide bonds, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **5**, 85–91.
15. Grigorenko, V., Chubar, T., Kapeliuch, Yu., Borchers, T., Spener, F., and Egorov, A. (1999) New approaches for functional expression of recombinant horseradish peroxidase C in *Escherichia coli*, *Biocatal. Biotransform.*, **17**, 359–397.
16. Lindbladh, C., Mosbach, K., and Bulow, L. (1993) Use of genetically prepared enzyme conjugates in enzyme immunoassay, *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 279–283.
17. Porstman, T., and Kiessig, S.T. (1992) Enzyme immunoassay techniques. An overview, *J. Immunol. Methods*, **150**, 5–21.
18. Offensperger, W., Wahl, S., Neurath, A.R., Price, P., Strick, N., Kent, S.B., Christman, J.K., and Acs, G. (1985) Expression in *Escherichia coli* of a cloned DNA sequence encoding the pre-S2 region of hepatitis B virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7540–7544.
19. Peterhans, A., Mecklenburg, M., Meussdoerffer, F., and Mosbach, K. (1987) A simple competitive enzyme-linked immunosorbent assay using antigen-β-galactosidase fusions, *Anal. Biochem.*, **163**, 470–475.
20. Markaryan, A.N., Mashko, S.V., Kukel, L.V., Lapidus, A.L., Bach, A.N., and Egorov, A.M. (1991) Construction of expression vectors for gene fusions on the model of β-galactosidase-human fibroblast beta-interferon for the purpose of immunoenzyme assay, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **646**, 125–135.
21. Lindbladh, C., Persson, M., Bulow, L., Stahl, S., and Mosbach, K. (1987) The Design of a Simple Competitive ELISA Using Human Proinsulin-Alkaline Phosphatase Conjugates Prepared by Gene Fusion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **149**, 607–614.
22. Gillet, D., Ezan, E., Ducancel, F., Gaillard, C., Ardouin, T., Istin, M., Menez, A., Boulain, J.-C., and Grognet, J.-M. (1993) Enzyme immunoassay using a rat prolactin-alkaline phosphatase recombinant tracer, *Anal. Chem.*, **65**, 1779–1784.
23. Ezan, E., Ducancel, F., Gillet, D., Drevet, P., Menez, A., Grognet, J.M., and Boulain, J.C. (1994) Recombinant technology in the preparation of immunogen and enzymatic tracer. Application to the development of an enzyme immunoassay for rat prolactin, *J. Immunol. Methods*, **169**, 205–211.
24. Ramanathan, S., Lewis, J.C., Kindy, M.S., and Daunert, S. (1998) Heterogeneous bioluminescence binding assay for an octapeptide using recombinant aequorin, *Anal. Chim. Acta*, **369**, 181–188.
25. Lewis, J.C., and Daunert, S. (1999) Dual detection of peptides in a fluorescence binding assay by employing genetically fused GFP and BFP mutants, *Anal. Chem.*, **71**, 4321–4327.
26. Baneyx, F., and Georgiu, G. (1989) Expression, purification and enzymatic characterization of a protein A-β-lactamase hybrid protein, *Enzyme Microbial Technol.*, **11**, 559–567.
27. Lindbladh, C., Mosbach, K., and Bulow, L. (1991) Preparation of a genetically fused protein A/luciferase conjugate for use in bioluminescent immunoassays, *J. Immunol. Methods*, **137**, 199–207.
28. Wittkowski, A., Daunert, S., Kindy, M.S., and Bachas, L.G. (1993) Enzyme-linked immunosorbent assay for an octapeptide based on a genetically engineered fusion protein, *Anal. Chem.*, **65**, 1147–1151.
29. Schreiber, A., Specht, B., Pelsers, M.M.A.L., Glatz, J.F.C., Borchers, T., and Spener, F. (1998) Recombinant human heart-type fatty acid-binding protein as standard in immunochemical assays, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **36**, 283–288.
30. Rau, D., Kramer, K., and Hock, B. (2002) Single-chain Fv antibody-alkaline phosphatase fusion proteins produced by one-step cloning as rapid detection tools for ELISA, *J. Immunoassay Immunochem.*, **23**, 129–143.
31. Tachibana, H., Takekoshi, M., Cheng, X.J., Nakata, Y., Takeuchi, T., and Ihara, S. (2004) Bacterial expression of a human monoclonal antibody-alkaline phosphatase conjugate specific for *Entamoeba histolytica*, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **11**, 216–218.
32. Mousli, M., Turki, I., Kharmachi, H., Saadi, M., and Dellagi, K. (2007) Recombinant single-chain Fv antibody fragment-alkaline phosphatase conjugate: a novel *in vitro* tool to estimate rabies viral glycoprotein antigen in vaccine manufacture, *J. Virol. Methods*, **146**, 246–256.
33. Dong, J.X., Li, Z.F., Lei, H.T., Sun, Y.M., Ducancel, F., Xu, Z.L., Boulain, J.C., Yang, J.Y., Shen, Y.D., and Wang, H. (2012) Development of a single-chain variable fragment-alkaline phosphatase fusion protein and a sensitive direct competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for detection of ractopamine in pork, *Anal. Chim. Acta*, **736**, 85–91.
34. Xu, Z.L., Dong, J.X., Wang, H., Li, Z.F., Beier, R.C., Jiang, Y.M., Lei, H.T., Shen, Y.D., Yang, J.Y., and Sun, Y.M. (2012) Production and characterization of a single-chain variable fragment linked alkaline phosphatase fusion protein for detection of O,O-diethyl organophosphorus pesticides in a one-step enzyme-linked immunosorbent assay, *J. Agric. Food Chem.*, **60**, 5076–5083.
35. Patel, K.G., Ng, P.P., Kuo, C.C., Levy, S., Levy, R., and Swartz, J.R. (2009) Cell-free production of Gaussia princeps luciferase-antibody fragment bioconjugates for *ex vivo* detection of tumor cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390**, 971–976.
36. Joosten, V., Roelofs, M.S., van den Dries, N., Goosen, T., Verrips, C.T., van den Hondel, C.A., and Lokman, B.C. (2005) Production of bifunctional proteins by *Aspergillus awamori*: llama variable heavy chain antibody fragment (V(HH)) R9 coupled to *Arthromyces ramosus* peroxidase (ARP), *J. Biotechnol.*, **120**, 347–359.
37. Gillet, D., Ducancel, F., Pradel, E., Leonetti, M., Menez, A., and Boulain, J.C. (1992) Insertion of a disulfide-containing neurotoxin into *E. coli* alkaline phosphatase: the hybrid retains both biological activities, *Protein Eng.*, **5**, 273–278.
38. Chanussot, C., Bellanger, L., Ligny-Lemaire, C., Seguin, P., Menez, A., and Boulain, J.C. (1996) Engineering of a recombinant colorimetric fusion protein for immunodiagnosis of insulin, *J. Immunol. Methods*, **197**, 39–49.
39. Kerschbaumer, R.J., Hirschl, S., Schwager, C., Ibl, M., and Himmler, G. (1996) pDAP2: a vector for construction of alkaline phosphatase fusion-proteins, *Immunotechnology*, **2**, 145–150.
40. Grigorenko, V., Andreeva, I., Borchers, T., Spener, F., and Egorov, A. (2001) A genetically engineered fusion protein

- with horseradish peroxidase as a marker enzyme for use in competitive immunoassays, *Anal. Chem.*, **73**, 1134–1139.
41. Wodzig, K.W.H., Pelsers, M.M.A.L., van der Vusse, G.J., Roos, W., and Glatz, J.F.C. (1997) One-step enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for plasma fatty acid-binding protein, *Ann. Clin. Biochem.*, **34**, 263–268.
 42. Nakane, P.K., and Kawaoi, A. (1974) Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation, *J. Histochem. Cytochem.*, **22**, 1084–1091.
 43. Robin, S., Petrov, K., Dintinger, T., Kujumdzieva, A., Tellier, C., and Dion, M. (2003) Comparison of three microbial hosts for the expression of an active catalytic scFv, *Mol. Immunol.*, **39**, 729–738.
 44. Cupit, P.M., Whyte, J.A., Porter, A.J., Browne, M.J., Holmes, S.D., Harris, W.J., and Cunningham, C. (1999) Cloning and expression of single chain antibody fragments in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*, *Lett. Appl. Microbiol.*, **29**, 273–277.
 45. Morawski, B., Lin, Z., Cirino, P., Joo, H., Bandara G., and Arnold, F.H. (2000) Functional expression of horseradish peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*, *Protein Eng.*, **13**, 377–384.
 46. Pennell, C.A., and Eldin, P. (1998) *In vitro* production of recombinant antibody fragments in *Pichia pastoris*, *Res. Immunol.*, **149**, 599–603.
 47. Fischer, R., Drossard, J., Emans, N., Commandeur, U., and Hellwig, S. (1999) Towards molecular farming in the future: *pichia pastoris*-based production of single-chain antibody fragments, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **30**, 112–117.
 48. Freyre, F.M., Vazquez, J.E., Ayala, M., Canaan-Haden, L., Bell, H., Rodriguez, I., Gonzalez, A., Cintado, A., and Gaviolondo, J.V. (2000) Very high expression of an anti-carcinoembryonic antigen single chain Fv antibody fragment in the yeast *Pichia pastoris*, *J. Biotechnol.*, **76**, 157–163.
 49. Takahashi, K., Yuuki, T., Takai, T., Ra, C., Okumura, K., Yokota, T., and Okumura, Y. (2000) Production of humanized Fab fragment against human high affinity IgE receptor in *Pichia pastoris*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 2138–2144.
 50. Andrade, E.V., Albuquerque, F.C., Moraes, L.M., Brigido, M.M., and Santos-Silva, M.A. (2000) Single-chain Fv with Fc fragment of the human IgG1 tag: construction, *Pichia pastoris* expression and antigen binding characterization, *J. Biochem. (Tokyo)*, **128**, 891–895.
 51. Luo, D., Geng, M., Schultes, B., Ma, J., Xu, D.Z., Hamza, N., Qi, W., Noujaim, A.A., and Madiyalakan, R. (1998) Expression of a fusion protein of scFv-biotin mimetic peptide for immunoassay, *J. Biotechnol.*, **65**, 225–228.
 52. Powers, D.B., Amersdorfer, P., Poul, M., Nielsen, U.B., Shalaby, M.R., Adams, G.P., Weiner, L.M., and Marks, J.D. (2001) Expression of single-chain Fv-Fc fusions in *Pichia pastoris*, *J. Immunol. Methods*, **251**, 123–135.
 53. Hellwig, S., Emde, F., Raven, N.P., Henke, M., van der Logt, P., and Fischer, R. (2001) Analysis of single-chain antibody production in *Pichia pastoris* using on-line methanol control in fed-batch and mixed-feed fermentations, *Biotechnol. Bioeng.*, **74**, 344–352.
 54. Lange, S., Schmitt, J., and Schmid, R.D. (2001) High-yield expression of the recombinant, atrazine-specific Fab fragment K411B by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *J. Immunol. Methods*, **255**, 103–114.
 55. Koliashnikov, O.V., Grigorenko, V.G., Egorov, A.M., Lange, S., and Schmid, R.D. (2011) Recombinant Production of Horseradish Peroxidase Conjugates with Fab Antibodies in *Pichia pastoris* for Analytical Applications, *Acta Naturae*, **3**, 85–92.
 56. Kramer, K., and Hock, B. (1996) Recombinant single-chain antibodies against s-triazines, *Food Agric. Immunol.*, **8**, 97–109.

RECOMBINANT HORSERADISH PEROXIDASE: PRODUCTION AND ANALYTICAL APPLICATIONS

V. G. Grigorenko^{1*}, I. P. Andreeva¹, M. Yu. Rubtsova¹,
A. M. Egorov^{1,2}

¹ M. V. Lomonosov Moscow State University, Chemical Department,
Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-2742,
E-mail: vitaly.grigorenko@gmail.com

² Russian Medical Academy of Post-Graduate Education,
Microbiology Department, Moscow 125993, Russia

Received November 14, 2014
Revision received December 9, 2014

Horseradish peroxidase is a key marker enzyme in bio- and immunochemical analyte. New approaches in functional expression of the peroxidase gene in *E. coli* cells and the subsequent refolding process yielded a recombinant enzyme that is comparable in its spectral and catalytic characteristics to those of the native plant peroxidase. Genetic engineering of fusions of antigens, antibodies, and enzymes has opened prospects of reproducibly producing recombinant conjugates of peroxidase with protein antigens and Fab antibody fragments. This review discusses the use of recombinant horseradish peroxidase as a marker enzyme in ELISA and in amperometric sensors based on direct electron transfer.

Key words: horseradish peroxidase, recombinant conjugate, amperometric biosensor