

УДК 577.217

## ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ БЕЛКОВ МЕМБРАНЫ МАГНЕТОСОМ

© 2013 г. Д. С. Груздев\*, \*\*, М. В. Дзюба\*, А. С. Герасимов\*, Б. Б. Кузнецов\*

\* Центр “Биоинженерия” РАН, Москва, 117312

\*\* Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

e-mail: denisgrouzdev@gmail.com

Поступила в редакцию 19.11.2012 г.

Синтезированы генетические конструкции, кодирующие мембранный белок магнитотактической бактерии *Magnetospirillum magnetotacticum* Mam12 с одним (mb), двумя доменами В и Z (mbb и mzz) белка А *Staphylococcus aureus*. Проведены экспрессия, фракционирование, очистка гибридных белков и исследована активность модифицированных белков. На основании результатов ИФА был сделан вывод, что все модифицированные белки проявляют иммуноглобулинсвязывающую активность.

DOI: 10.7868/S0555109913030094

Одним из направлений использования нанотехнологий в биологии и медицине является разработка и усовершенствование методов визуализации, идентификации и анализа биоматериала, обеспечивающих высокую степень разрешения. В качестве успешного примера внедрения таких технологий можно назвать диагностику заболеваний при помощи антител, иммобилизованных на поверхности магнитных частиц [1–3]. В настоящее время наиболее часто используемым методом иммобилизации иммуноглобулинов является химическая сшивка антител с поверхностью частиц [4]. Открытие магнитотактических бактерий, способных синтезировать магнетосомы – магнитные частицы, содержащие однодоменные кристаллы магнетита ( $Fe_3O_4$ ) или грейгита ( $Fe_3S_4$ ), размером от 35 до 120 нм, открыло новые возможности развития данного направления [5].

Принципиальной отличительной особенностью частиц, продуцируемых магнитотактическими бактериями, является их компарментализация в липопротеиновые везикулы. Липопротеиновая мембрана является удобной платформой для экспонирования диагностических мишеней на их поверхности. Существует несколько способов модификации поверхности бактериальных магнитных наночастиц. Один из наиболее перспективных методов заключается в конструировании гибридных белков мембраны магнетосом, содержащих искусственно добавленные иммуноглобулинсвязывающие домены, к примеру, стафилококкового белка А, и последующее их встраивание в мембрану магнетосом *in vitro*. Данный подход потенциально более перспективен, чем метод химической сшивки, т.к. предполагает более строгое ориентирование антител на поверх-

ности наночастиц [6]. Для конструирования гибридных белков нами был выбран белок мембраны магнетосом магнитотактической бактерии *Magnetospirillum magnetotacticum* Mam12. В других исследованиях было показано, что белок Mam12 мембраноактивен и потенциально является эффективной якорной молекулой [7].

Цель работы – получение и исследование функциональной активности гибридных белков, состоящих из белка Mam12 мембраны магнетосом магнитотактической бактерии *M. magnetotacticum* и иммуноглобулинсвязывающих доменов белка А *Staphylococcus aureus*.

### МЕТОДИКА

**Бактериальные штаммы и питательные среды.** В работе были использованы штаммы *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 (DSM-3856) и *Staphylococcus aureus* (ВКПМ 1899), штаммы *Escherichia coli* XL-1 Blue (“Stratagene”, США) и BL21(DE3) (“Novogene”, США). Для генно-инженерных манипуляций использовали вектор pET23a(+) (“Novogene”, США), нуклеотидная последовательность, кодирующая домен Z, была синтезирована компанией “Евроген” (Россия).

Бактериальные клетки *E. coli* XL-1 Blue выращивали в питательной среде LB [8]. Экспрессию рекомбинантных белков осуществляли в питательной среде ТВ [9]. Твердую среду для выращивания одиночных колоний *E. coli* на чашках Петри получали добавлением к LB 2% агара.

**Конструирование экспрессионных векторов pET23a(+)/mb, pET23a(+)/mbb, pET23a(+)/mzz.** Приготовление компетентных клеток *E. coli*, трансформация клеток плазмидной ДНК, выде-

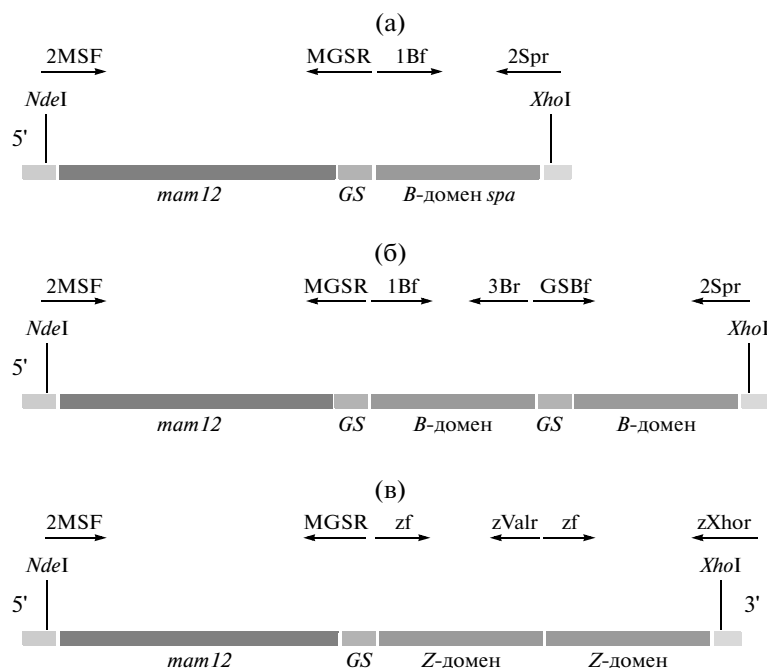


Рис. 1. Схема получения генетических конструкций mb (а), mbb (б), mzz (в).

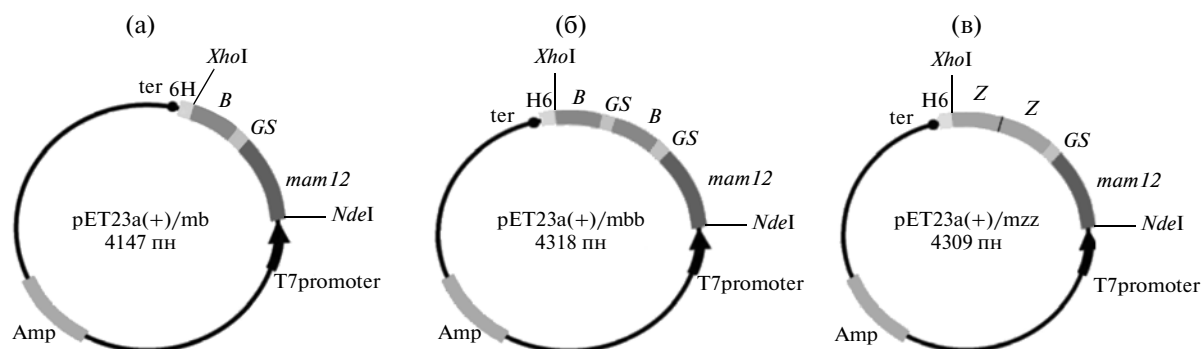
ление плазмидной ДНК, гидролиз эндонуклеазами рестрикции, фосфорилирование, электрофорез в агарозном геле и другие стандартные манипуляции проводились в соответствии с методиками [9] и согласно рекомендациям фирм-производителей соответствующих ферментов.

Генетические конструкции mb, mbb, mzz были получены с помощью ПЦР лигазных интермедиагов (рис. 1). Амплификацию проводили с использованием разработанных праймеров (табли-

ца). Генетические конструкции гидролизовали рестриктазами NdeI и XhoI и клонировали по соответствующим сайтам в вектор pET23a(+), обеспечивающий высокий уровень конститутивной экспрессии целевого гена. Наличие гистидинового тага на С-конце гетерологично экспрессируемых белков позволяет в дальнейшем легко идентифицировать и очищать при помощи хелатирующих сорбентов. Рекомбинантными плазмидами pET23a(+)/mb, pET23a(+)/mbb, pET23a(+)/mzz (рис. 2) трансформировали клетки *E. coli* XL-1

Праймеры, использованные для проведения ПЦР

Название	Нуклеотидная последовательность 5'-3'
MGSR	TCCACTTCCACTCCGGCCAGTTCGTCCCGCAAGATGT
3BR	TTTTGGTGCTTGTGCATCATTTAGC
1BF	GATAACAAATTCAACAAAGA
2MSF	GGGCATATGCCCTTTCACCTTGCCCC
2SprR	GGGCATATGCCCTTTCACCTTGCCCC
GSBf	GGAAGTGGAAGTGGAGATAACAAATTCAACAAAGAAC
T7F	TAATACGACTCACTATAGG
T7R	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
GSBf	GGAAGTGGAAGTGGAGGATAACAA
zf	GACAACAAATTCAACAAAGAACAAC
zValr	TACTTTCGGCGCCTGAGCATCATT
zXhoTr	AGTCGTATTACTCGAGTACTTTCGGCGCCTGAGCATCAT



**Рис. 2.** Карта плазмид pET23a(+)/mb (а), pET23a(+)/mbb (б), pET23a(+)/mzz (в). Нуклеотидная последовательность, кодирующая: глицин-сериновый шарнир (GS), домен В белка А (В), домен Z (Z), H6 – гексагистидиновый таг (H6).

Blue. Клоны, несущие плазмиды с целевыми вставками, были отобраны с помощью ПЦР-скрининга и последующего секвенирования вставок с использованием набора реактивов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США). Нуклеотидные последовательности определяли на автоматических секвенаторах ABI 3730 (“Applied Biosystems”, США).

**Получение гибридных белков.** Экспрессионными векторами pET23a(+)/mb, pET23a(+)/mbb, pET23a(+)/mzz трансформировали клетки *E. coli* BL21 (DE3). Экспрессию генетических конструкций проводили методом автоиндукции [9].

**Анализ суммарного белка клеток *E. coli* BL21(DE3).** Клетки, собранные из 1 мл среды, суспендировали в 100 мкл ТЭД-буфера (10 мМ трис-НСl, рН 6.8, 1 мМ ЭДТА, 1%-ный ДДС-Na), а затем инкубировали при 100°C в течение 5 мин. Полученный лизат анализировали при помощи электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях по Лэммли. Концентрацию белков в растворе определяли по методу, предложенному Бредфорд, исходя из калибровочной кривой для БСА.

**Вестерн-блот.** Для визуализации при помощи вестерн-блота разделенные гель-электрофорезом по методу Лэммли белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану “Hybond-P” (“GE Healthcare”, США) по методу [10]. Окрашивание мембраны проводили с помощью моноклональных антител к гистидинового тагу в разведении 1 : 1000 и конъюгата вторичных антител с щелочной фосфатазой в разведении 1 : 5000. Хромагенные субстраты BCIP-T и NBT (“Fermentas”, Литва) применяли согласно инструкции фирмы-изготовителя.

**Фракционирование растворимых клеточных белков *E. coli*.** Клетки, собранные из 1 мл среды, суспендировали в 50 мкл буфера I (100 мМ трис-НСl, рН 8.0, 0.5 М сахароза, 0.5 мМ ЭДТА). Добавляли фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) до конечной концентрации 0.1 мМ и 2.5 мкл растворенного в том же буфере лизоцима (2 мг/мл).

Инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин, добавляли 100 мкл буфера I и 100 мкл воды, перемешивали и инкубировали 10 мин. Добавляли равный объем водного раствора Triton X-100 (0.2%) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Клеточную суспензию трижды замораживали при –20°C и размораживали при комнатной температуре. Центрифугировали при 12000 g в течение 3 мин. Супернатант представлял собой фракцию растворимых белков, а осадок – фракцию нерастворимых белков. Осадок ресуспендировали в 100 мкл лизирующего буфера с добавлением Triton X-100 до конечной концентрации 0.1%.

С целью получения препарата мембранной фракции 150 мл ночной культуры центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин. Клетки суспендировали в 15 мл буфера I, добавляли 3 мл лизоцима (2 мг/мл), растворенного в том же буфере. Суспензию инкубировали при комнатной температуре 30 мин, после чего добавляли 135 мл буфера I, 150 мкл 0.1 мМ ФМСФ, 300 мкл 0.5 М ЭДТА. Обрабатывали образец ультразвуком на приборе Sonopuls UW2070 (“Vandelin”, Германия) с частотой 20 кГц, в течение 10 мин. Клеточный дебрис отделяли центрифугированием при 6000 g в течение 30 мин. Мембранную фракцию осаждали центрифугированием супернатанта при 100000 g в течение 2 ч при +4°C.

**Очистка гибридных белков.** Очистка гибридных белков была осуществлена с помощью металлохелатной аффинной хроматографии (МХАХ). Полученный препарат мембранной фракции суспендировали в буфере А (20 мМ трис-НСl, рН 8.0, 500 мМ NaCl, 5%-ный глицерин, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 10 мМ имидазол, 2 мМ ФМСФ, 1.5%-ный лаурил саркозин) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Солубилизованную мембранную фракцию наносили на сорбент “Ni-NTA agarose” (“Invitrogen”, США), предварительно уравновешенный буфе-

ром А. Далее осуществляли промывку сначала буфером А (не менее 3 объемов сорбента), а затем 3 объемами сорбента буфером В (20 мМ трис-НСl, рН 8.0, 1 М NaCl, 5%-ный глицерин, 5 мМ имидазол, 1%-ный лаурил саркозин). Элюцию целевого белка проводили буфером С (20 мМ трис-НСl, рН 7.5, 130 мМ NaCl, 5%-ный глицерин, 500 мМ имидазол, 0.5%-ный лаурил саркозин). Элюат диализовали против буфера 20 мМ трис-НСl, рН 7.5, 50 мМ NaCl, 10%-ный глицерин, 14.6 мМ лаурилсаркозин в течение ночи при +4°C.

**Иммуноферментный анализ.** Способность связывания модифицированных белков с антителами определяли с помощью ИФА. В лунках сорбировали 1 мг инсулина человека в течение ночи при +4°C. Остаточную сорбцию блокировали 1.5%-ным раствором БСА в твин-фосфатном буфере (137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01%-ный NaN<sub>3</sub>, 0.05%-ный твин 20) в течение 1 ч. Далее добавляли 0.1 мкг моноклональных антител мыши против инсулина человека (“Имтек”, Россия) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Лунки отмывали 4 раза твин-фосфатным буфером, после чего наносили с заданными разведениями гибридные белки и инкубировали в течение 1 ч. После аналогичной отмывки в течение 1 ч инкубировали 0.1 мкг антител мыши против гистидинового тага (“Имтек”, Россия); система детекции – пероксид водорода/пероксидаза хрена, хромогенный субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (“Sigma”, США). В качестве отрицательного контроля использовали полипептид, несущий гистидиновый таг на С-конце.

Специфичность взаимодействия определяли путем вычисления константы диссоциации комплекса гибридного белка с антителом, согласно [11]. В условиях данного эксперимента в каждую лунку наносили по 1 мкг гибридного белка. После блокирования поверхности лунки, добавляли антитела кролика к Fc-фрагменту иммуноглобулина G мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена в заданных разведениях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Проектирование и сборка генетических конструкций.** Было осуществлено проектирование трех генетических конструкций – mb, mbb и mzz. В состав всех конструкций входила нуклеотидная последовательность, кодирующая мембранный белок Mam12 магнетосом *M. magnetotacticum*. Белок Mam12 имеет два трансмембранных домена и район между этими трансмембранными доменами, который находится внутри магнетосомальных везикул. Короткий N-конец (11 аминокислот) и длинный C-конец (36 аминокислот), обращены в цитоплазму [4]. Ранее было показано, что

Mam12 является эффективным якорным белком, поскольку наиболее распространен в мембране магнетосом, выдерживает триптический гидролиз и способен прочно удерживаться в мембране при различных условиях [12].

Генетическая конструкция mb содержала нуклеотидную последовательность, кодирующую гибридный полипептид, в котором бактериальный белок Mam12 соединен С-концом через глицин-сериновый линкер с одним иммуноглобулинсвязывающим доменом В белка А. Генетическая конструкция Mbb два домена В, разделенные глицин-сериновым линкером, и в Mzz – с двумя доменами Z (синтетическим аналогом домена В белка А *S. aureus*) [13]. Наличие гибких глицин-сериновых линкеров помогает избежать потенциальных проблем с фолдингом гибридных белков.

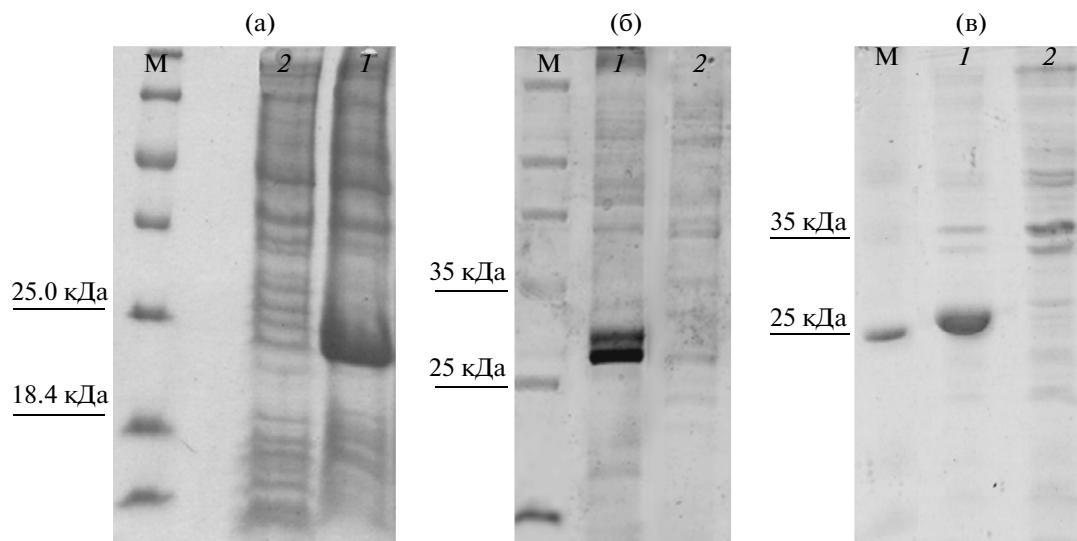
**Экспрессия генетических конструкций mb, mbb и mzz.** В качестве штамма-хозяина *E. coli* был выбран BL21(DE3). Преимуществом штамма *E. coli* BL21(DE3) является наличие фенотипа Lon OmpT, что позволяет исключить возможность протеолитического расщепления синтезируемого рекомбинантного белка и загрязнения препарата протеазами *E. coli*. В хромосомную ДНК BL21(DE3) интегрирован ген, кодирующий T7-РНК полимеразу, что, совместно с использованием T7 промотора и T7 терминатора в плазмиде pET23a(+), обеспечивает быструю и эффективную продукцию белка в клетках *E. coli* после индукции лактозой [9].

Методом автоиндукции была проведена экспрессия полученных генетических конструкций. В результате экспрессии генетической конструкции mb на электрофореграмме (рис. 3) выявляется полоса белка с молекулярной массой ~21 кДа, конструкций mbb и mzz ~26 кДа, что соответствует расчетным массам модифицированных белков.

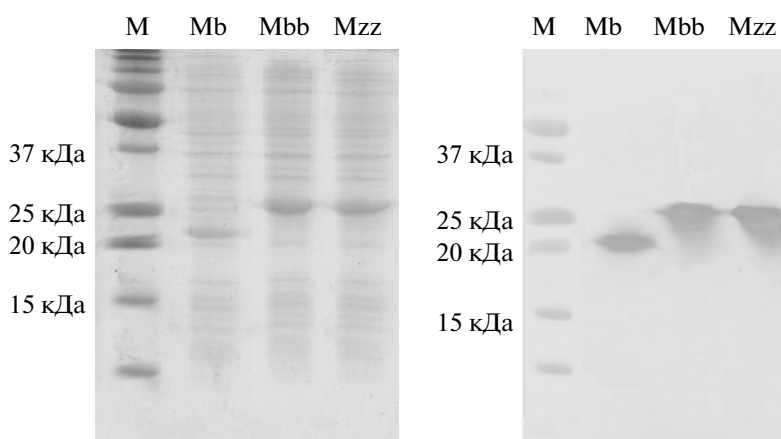
С целью получения максимального выхода белка в растворимой форме проводили оптимизацию температуры выращивания бактерий (37, 28 или 13°C). Гибридные белки Mb, Mbb и Mzz при температуре клеточного роста 37°C накапливались преимущественно в тельцах включения. При температуре культивирования 28 или 13°C гибридные белки были локализованы в мембранной фракции белков штамма-продуцента. Так как рост бактерий происходил значительно быстрее при 28°C, эта температура была выбрана в качестве оптимальной для экспрессии запланированных генетических конструкций.

С помощью вестерн-блот-анализа (рис. 4) с окрашиванием антителами к гистидиновому тагу, было показано, что произошла экспрессия целевых генетических конструкций.

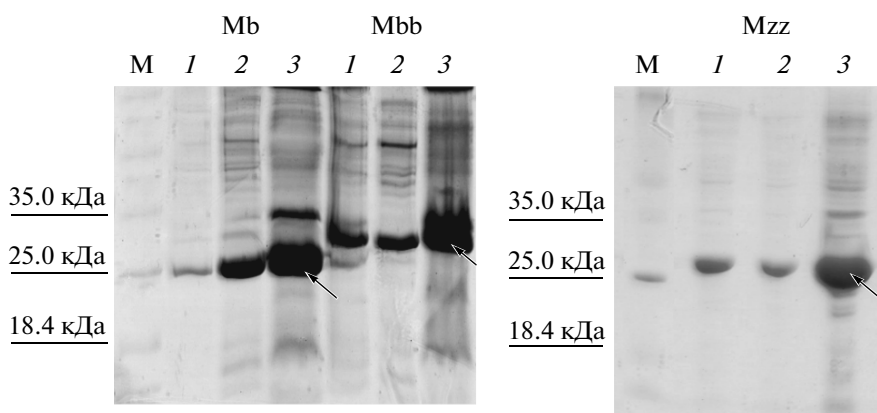
Для определения локализации целевого белка в клетке было проведено исследование фракций



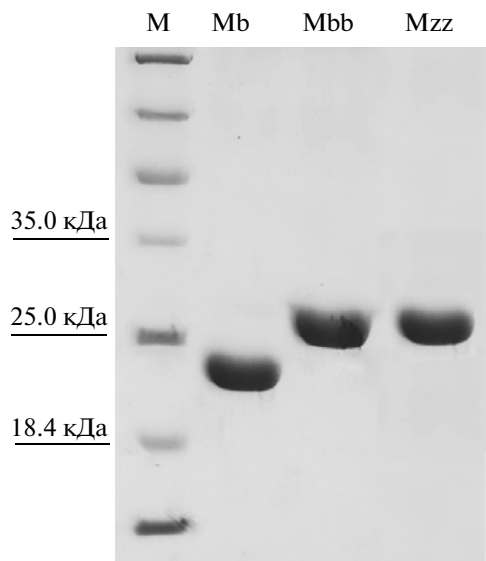
**Рис. 3.** Электрофоретический анализ накопления белка Mb (а), Mbb (б), Mzz (в) в клетках *E. coli* BL-21(DE3). (а) М – маркер молекулярной массы белка, лизат клеток штамма после аутоиндукции (1), лизат клеток штамма до индукции (2).



**Рис. 4.** Вестерн-блот-анализ экспрессии генетических конструкций.



**Рис. 5.** Электрофоретический анализ накопления белков Mb, Mbb, Mzz в клетках *E. coli* BL-21(DE3). М – маркер молекулярной массы белка, фракции растворимых белков (1), нерастворимых белков (2), мембранных белков (3). Полосы, соответствующие целевым белкам, указаны стрелкой.



**Рис. 6.** Электрофоретический анализ очищенных гибридных белков с помощью МХАХ. М – маркер молекулярной массы белка.

растворимых, нерастворимых и мембранных белков клеточного лизата штамма-продуцента и показано, что гибридные белки находятся преимущественно в мембранной фракции (рис. 5).

Наличие гексагистидиновой последовательности на С-конце гибридных белков позволило одностадийно получить высокоочищенный препарат белков при помощи МХАХ (рис. 6).

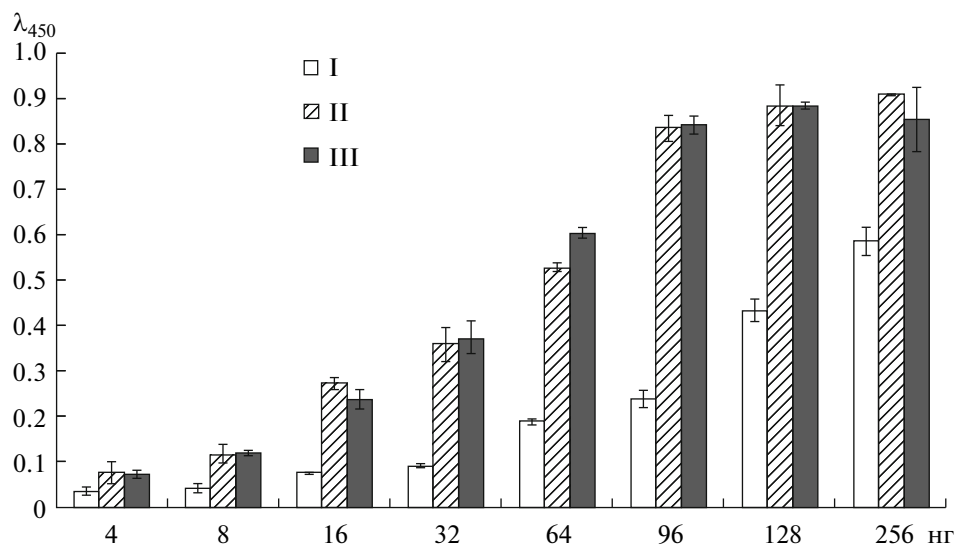
**Активность модифицированных белков.** Для определения способности гибридных белков связывать иммуноглобулины проводили ИФА. С инсулином человека, адсорбированным на поверх-

ности лунок, связывали первичные антитела против инсулина, что обеспечивало однозначную ориентацию первичных антител. Гибридные белки, имеющие в своем составе иммуноглобулинсвязывающий домен, связывали Fc-фрагмент первичных антител. Результаты ИФА свидетельствуют о проявлении иммуноглобулинсвязывающей активности гибридными белками (рис. 7).

Для определения уровня связывания антител гибридными белками была вычислена константа аффинности комплекса гибридного белка с антителом. В результате было показано, что белки Mbb и Mzz проявляют сравнимый высокий уровень специфичности взаимодействия с антителами:  $K_{\text{aff}}(\text{Mbb}) = 1.59 \pm 0.12$  нМ,  $K_{\text{aff}}(\text{Mzz}) = 1.44 \pm 0.16$  нМ, тогда как константа аффинности между белком Mb и антителами существенно различалась –  $K_{\text{aff}}(\text{Mb}) = 4.83 \pm 0.34$  нМ, что свидетельствует о более низком уровне специфичности взаимодействия.

На основании результатов ИФА был сделан вывод, что все модифицированные белки проявляют иммуноглобулинсвязывающую активность. Белки Mbb и Mzz связывали большее количество антител по сравнению с Mb, что подтверждает большую эффективность связывания с Fc-фрагментом антител двойного В домена и его синтетического аналога домена Z по сравнению с одинарным. Полученные данные позволяют сделать вывод, что гибридные белки пригодны для модификации бактериальных магнетосом *in vitro*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного контракта Минобрнауки РФ 16.512.11.2128 на оборудовании АЦКП “Биоинженерия” в рамках ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития



**Рис. 7.** Уровень связывания антител гибридными белками: Mb (I), Mbb (II), Mzz (III).

научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы”.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liu X., Dai Q., Austin L. // J. Amer. Chem. Soc. 2008. V. 130. № 9. P. 2780–2782.
2. Yang J., Lee C.-H., Seo S., Lim E.-K., Song Y., Suh J.-S., Yoon H.-G., Huh Y.-M., Haam S. // J. Mater. Chem. 2007. № 17. P. 2695–2699.
3. Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Elst L.V., Muller R.N. // Chem. Rev. 2008. V. 108. № 6. P. 2064–2110.
4. Scheffel A., Gärdes A., Grünberg K., Wanner G., Schüler D. // J. Bacteriol. 2008. V. 190. № 1. P. 377–386.
5. Faivre D., Schuler D. // Chem. Rev. 2008. V. 108. № 11. P. 4875–4898.
6. Matsunaga T., Togo H., Kikuchi T., Tanaka T. // Biotechnol. Bioeng. 2000. V. 70. № 6. P. 704–709.
7. Taoka A., Asada R., Sasaki H., Anzawa K., Wu L.F., Fukumori Y. // J. Bacteriol. 2006. V. 188. № 11. P. 3805–3812.
8. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 545 p.
9. Studier F.W. // Protein Expression and Purification. 2005. № 41. P. 207–234.
10. Towbin H., Strahelin T., Gordon J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979. V. 76. № 9. P. 4350–4354.
11. Loomans E.M.G., Roelen A.J.M., Van Damme H.S., Bloemers H.P.J., Gribau T.C.J., Schielen W.J.C. // J. Immunol. Methods. 1995. V. 184. № 2. P. 207–217.
12. Grünberg K., Muller E.C., Otto A., Reszka R., Linder D., Kube M., Reinhardt R., Schüler D. // Appl. Environ. Microb. 2004. V. 70. № 2. P. 1040–1050.
13. Nilsson B., Moks T., Jansson B., Abrahmsén L., Elmlad A., Holmgren E., Henrichson C., Jones T.A., Uhlén M. // Protein Eng. 1987. № 1. P. 107–113.

## Production of Modified Magnetosome Membrane Proteins and Analysis of Their Activity

D. S. Gruzdev<sup>a, b</sup>, M. V. Dzyuba<sup>a</sup>, A. S. Gerasimov<sup>a</sup>, and B. B. Kuznetsov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Bioinzheneriya Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

e-mail: denisgrouzdev@gmail.com

<sup>b</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

Received November 19, 2012

**Abstract**—Genetic constructs coding for the fusion of the Mam12 membrane protein from the magnetotactic bacteria *Magnetospirillum magnetotacticum* with one B-domain (mb) or two B or Z domains (mbb and mzz, respectively) of *Staphylococcus aureus* protein A have been synthesized. Expression, fractionation, and purification of fusion proteins have been performed, and the activity of the modified proteins has been characterized. ELISA results showed that all modified proteins displayed immunoglobulin-binding activity.