



УДК 577.112.2

ЗАВИСИМОСТЬ СТАБИЛЬНОСТИ ГИБРИДОВ ЗЕЛЕННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА С ОБЕЛИНОМ ОТ ПРИРОДЫ СОСТАВЛЯЮЩИХ ИХ МОДУЛЕЙ И СТРУКТУРЫ АМИНОКИСЛОТНОГО ЛИНКЕРА

© 2001 г. В. С. Скосырев*, А. Ю. Гороховатский*, Л. М. Винокуров*,
Н. В. Руденко*, Т. В. Ивашина**, В. Н. Ксензенко***, Ю. Б. Алахов**

* Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
142290, г. Пуцино Московской обл.;

** Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
142290, г. Пуцино Московской обл.;

*** Институт белка РАН,
142290, г. Пуцино Московской обл.

Поступила в редакцию 16.08.2000 г. Принята к печати 16.04.2001 г.

Получены генно-инженерные конструкции, содержащие гены зеленого флуоресцентного белка (GFP) из *Aequorea victoria* и фотобелка обелина из *Obelia longissima*, соединенные в единой рамке считывания вставками, различающимися по нуклеотидной последовательности. В результате экспрессии химерных генов в клетках *Escherichia coli* происходит синтез гибридных белков GFP–обелин. Эти белки очищены до гомогенного состояния и подвергнуты ограниченному трипсинолизу. Показано, что устойчивость гибридных белков GFP–обелин к действию трипсина зависит как от природы составляющих их модулей, так и от аминокислотных последовательностей соединяющих модули линкеров. Кинетика накопления полноразмерных гибридных белков в ходе роста бактериальных клеток не зависит от структуры пептидных линкеров. Основная часть полноразмерного продукта накапливается в клетках в виде телец включения, устойчивых к действию эндогенных протеиназ. Растворимая форма белка подвергается значительному протеолизу независимо от структуры пептидного линкера.

Ключевые слова: гибридные белки, пептидная вставка, стабильность; зеленый флуоресцентный белок; обелин.

ВВЕДЕНИЕ

Генно-инженерные методы обеспечили возможность конструирования так называемых гибридных белков, объединяющих в своем составе полипептидные цепи с разными функциональными свойствами. Наличие полифункциональных активностей в гибридных белках делает их привлекательными для решения научных и биотехнологических задач. Основной проблемой при получении гибридных белков является достижение нативной пространственной структуры, устойчивой к действию клеточных протеолитических ферментов. В настоящее время описан ряд подходов, позволяющих значительно уменьшить степень деградации гетерологичных белков в

клетке [1–3]. Секреция рекомбинантных полипептидов в периплазму клетки [4] и культуральную среду [5], использование клеточных штаммов с низкой протеолитической активностью [6], коэкспрессия с молекулярными шаперонами [7, 8], рост трансформированных клеток при пониженной температуре [9], замена определенных аминокислотных остатков с целью блокирования специфических участков для действия протеиназ [10] – это далеко не полный список возможностей для оптимизации синтеза необходимого белкового продукта *in vivo*. Несмотря на разнообразие подходов, в настоящий момент не существует универсального способа получения полноразмерных гибридных белков. В связи с этим существует необходимость более детального изучения процессов синтеза белка *in vivo* с учетом индивидуальных структурно-функциональных особенностей модулей, составляющих гибридную молекулу.

Существенным элементом, вносящим вклад в стабилизацию гибридной молекулы, является структура пептида, объединяющего функциональ-

Сокращения: DTT – 1,4-дителиотреит; GFP – зеленый флуоресцентный белок; GOB – гибридный белок GFP–обелин; IPTG – изопропил-1-тио-β-D-галактопиранозид; PMSF – фенилметилсульфонилфторид.

* Автор для переписки (тел.: (0967) 79-05-37; эл. почта: alakhov@fibkh.serpukhov.su).

Таблица 1. Схема трипсинализа гибридных белков GFP–обелин (1)–(3)

Гибридный белок	N-Концевой модуль гибридного белка (GFP)	Пептидная вставка	C-Концевой модуль гибридного белка (обелин)
GOb1		– P G T G –	–SSKYAVK [↑] LK [↑] KT [↑] D... ~27 кДа ~22 кДа
GOb2	...ELYK	–PGTATPATPTPTTARTAGTG–	–SSKYAVK [↑] LK [↑] KT [↑] D... ~29 кДа ~22 кДа предполагаемый участок расщепления
GOb3		–PGTRGRCSGRRGCWGRCTG– ~27 кДа ~24 кДа возможные участки расщепления	

ные модули. Обычно пептидная вставка представляет собой неструктурированный участок, который должен обеспечить эффективное сворачивание модулей, составляющих гибридный белок, а также возможность его расщепления на составляющие компоненты. Таким образом, часто именно этот участок – потенциальное место действия для внутриклеточных протеиназ.

Для выяснения зависимости устойчивости гибридной молекулы к протеолитическому расщеплению от природы пептидной вставки были использованы три различные по структуре линкерные аминокислотные последовательности, объединяющие зеленый флуоресцентный белок и обелин. Был изучен процесс протеолитической деградации полученных белков *in vivo*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве белковых модулей, образующих гибридный белок, были использованы зеленый флуоресцентный белок (GFP) из *Aequorea victoria* и Ca²⁺-активируемый фотобелок обелин из *Obelia longissima*. Способность эффективно продуцироваться в различных организмах, высокий квантовый выход флуоресценции, присутствие хромофора, не требующего для проявления активности дополнительных субстратов или кофакторов, а также необычно высокая стабильность молекулы к протеолизу и денатурации делает зеленый флуоресцентный белок идеальной репортерной молекулой для использования в гибридных белках [11]. В качестве C-концевого модуля в гибридной молекуле был использован обелин – люминесцентный белок из семейства кальцийсвязывающих фотобелков [12–14]. Ранее было показано [15], что обелин синтезируется в клетках *E. coli* с образованием телец включения, после выделения из которых он, несмотря на отсутствие жесткой структуры, может быть переведен в активную форму при инкубации со своим субстратом, целентеразином (3,7-дигидроимидазо[1,2-а]пирозин-3-он). Использование репортерных модулей в со-

ставе гибридного белка значительно облегчает детектирование целевого продукта на разных стадиях работы. Гены, кодирующие GFP и обелин с тремя разными линкерами между ними, клонировали в единой рамке считывания в векторе pET-11c₃ под контролем промотора транскрипции фага T7.

Для сохранения функциональных активностей белков в составе гибрида пептидная вставка должна иметь достаточную гибкость. Использование в составе гибрида линкеров, способных к образованию вторичной структуры (α -спиралей или β -структур), приводит к ограничению подвижности модулей, составляющих гибридный белок, и может отрицательно влиять на сохранение их функциональных свойств [16]. Исходя из этих соображений, при создании линкерных пептидов мы придерживались следующих условий:

- максимальная устойчивость к протеиназному воздействию (использование аминокислот, не образующих потенциальные участки протеолитического расщепления);

- неспособность к образованию вторичной структуры (введение в их состав остатков пролина).

В качестве линкерных пептидов использовали четырех- и девятнадцатичленные аминокислотные последовательности (табл. 1).

В гибридном белке GFP–обелин (GOb1) вставка состояла из четырех аминокислот -Pro-Gly-Thr-Gly- (табл. 1). C-Концевой остаток лизина в GFP [11] соединен с остатком пролина в линкере, образуя связь -Lys-Pro- (табл. 1), устойчивую к действию сериновых протеиназ. Гибридные белки GOb2 и GOb3 содержат в своем составе девятнадцатичленные пептидные линкеры. Как и в случае GOb1, в GOb2 и GOb3 C-концевой остаток лизина GFP блокирован пролином. Нуклеотидная последовательность, кодирующая пептидную вставку в GOb3, идентична нуклеотидной последовательности, кодирующей пептидную вставку в GOb2, но имеет обратную ориентацию. Таким образом, пептидная вставка в GOb3 абсолютно отличается

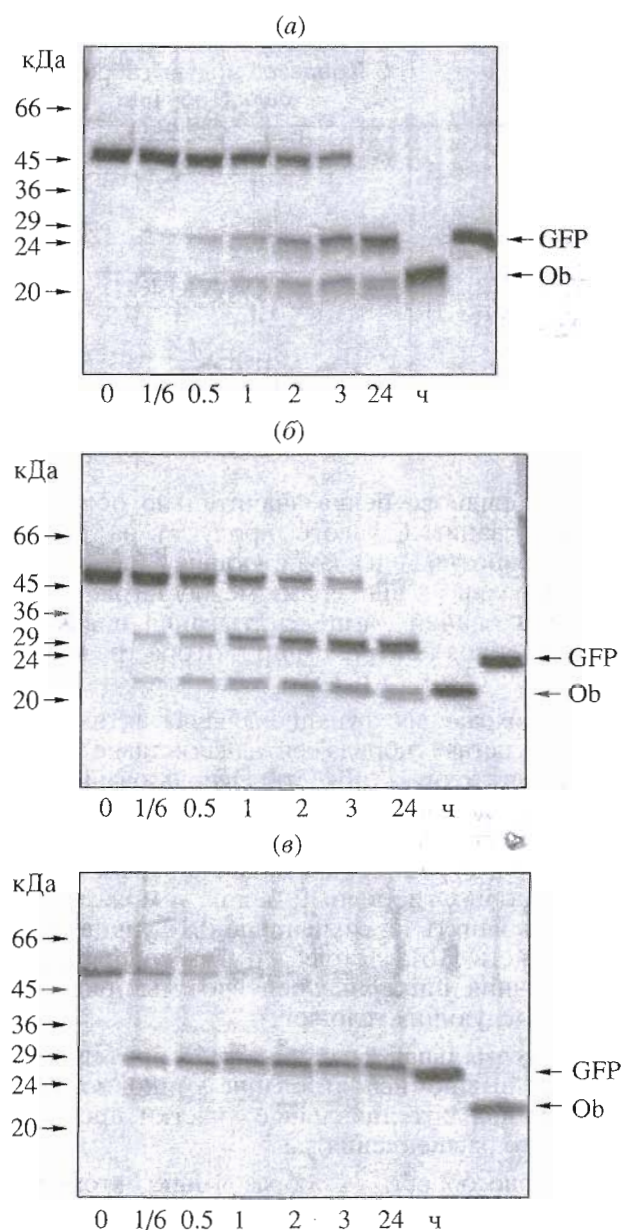


Рис. 1. Электрофоретический анализ продуктов триптического расщепления гибридных белков GOB1 (а), GOB2 (б), GOB3 (в). Условия ферментализации и электрофореза см. "Эксперимент. часть". Положение маркеров молекулярных масс, а также индивидуальных модулей GFP и обелина (Ob) указаны стрелками.

от пептидной вставки в GOB2 (табл. 1). Теоретически она наименее устойчива к действию сериновых протеиназ, так как содержит аминокислотные остатки аргинина. Кроме того, она содержит аминокислотные остатки цистеина и триптофана, что может существенно повлиять на структуру гибридной молекулы и на ее физические и функциональные свойства.

Для изучения вклада структуры линкерного пептида (вставки) и его ближайшего окружения в

процесс деградации гибридных белков *in vitro* был проведен сравнительный трипсинолиз предварительно ренатурированных и очищенных гибридных белков GOB1-GOB3. Выделенные белки обладали как люминесцентной активностью обелина, так и флуоресцентными свойствами GFP. Поскольку для проявления люминесцентной активности обелину необходимы ионы Ca^{2+} , в присутствии которых фотобелок приобретает необходимую конформацию, ограниченный протеолиз проводился в присутствии ионов кальция.

Гибридный белок GOB1 под действием трипсина образует ряд укороченных фрагментов (рис. 1а). Молекулярные массы мажорных фрагментов соответствуют ~27 и ~22 кДа, что находится в хорошем соответствии с размерами составляющих гибридный белок модулей GFP (~26.9 кДа) и обелина (~22.2 кДа). Это подтверждает предположение, что наиболее чувствительным к действию клеточных протеиназ участком является пептидная вставка и ее ближайшее окружение.

Несмотря на различия в длине пептидного линкера, протеолитический распад GOB2 аналогичен наблюдавшемуся для GOB1. Единственным отличием было образование полипептидного фрагмента с молекулярной массой около 29 кДа вместо фрагмента с молекулярной массой в ~27 кДа, образующегося при распаде GOB1. Именно длиной пептидной вставки объясняется разница в ~2 кДа (табл. 1, рис. 1б).

Исходя из анализа аминокислотной последовательности вставки молекулы GOB3, можно было ожидать низкую стабильность гибридного белка. Это предположение было подтверждено экспериментально. Как видно из рис. 1в, под действием трипсина основная часть гибридного белка в течение получаса деградировала до протеолитически устойчивого GFP (табл. 1). Следует отметить, что обелиновый модуль в процессе трипсинолиза двух других гибридных белков (GOB1 и GOB2) также подвергался значительному протеолитическому воздействию, что подтверждается снижением люминесцентной активности обелина в процессе трипсинолиза (рис. 2).

С целью выяснения вопроса о том, в какой степени данные об устойчивости гибридных белков к действию трипсина *in vitro* соответствуют стабильности этих белков *in vivo*, было проведено изучение процесса их деградации в ходе синтеза в бактериальной клетке.

Все химерные генные конструкции хорошо экспрессировались в клетках *E. coli*. При этом все продукты экспрессии в значительной мере накапливались в клетках в виде телец включения (табл. 2). Однако только клетки, несущие гены *gob1* и *gob2* имели зеленую флуоресцентную окраску, что говорит о присутствии функционально активного GFP. Несмотря на отсутствие флуоресцентной

окраски клеток в случае экспрессии гена *gob3*, последующая ренатурация белка GOb3 из тел включения также позволила получить активный гибридный белок.

Использование поликлональных кроличьих антител против протеолитически стабильного GFP дало возможность наблюдать за ходом деградации гибридных белков в процессе их синтеза. Из представленных иммуноблотов (рис. 3) видно, что в процессе биосинтеза гибридных белков GOb1 и GOb2 наряду с полноразмерным продуктом увеличивается доля деградированного белка. Несмотря на высокий уровень синтеза полноразмерного гибридного продукта, значительная часть гибридных белков (от 30 до 45%) находится в клетках в деградированном виде (табл. 2). Последующее разрушение клеток и разделение клеточного лизата на растворимую и нерастворимую фракции показало, что основная часть полноразмерного гибридного белка находится в нерастворимой фракции (тельца включения). Высокий уровень синтеза гибридных белков на основе GFP и способность обелина образовывать тельца включения обеспечили высокий процент полноразмерного белка, защищенного от протеолитического действия эндогенных протеиназ в составе тел включения. В растворимой фракции клеток гибридные белки в значительной мере подвергаются протеолизу, что подтверждается незначительным количеством полноразмерного белка (27–36%) относительно всего GFP-содержащего продукта (рис. 4).

Наблюдаемое поведение гибридных белков не является уникальным. Устойчивость продукта экспрессии к протеолизу в составе тел включения является общеизвестным фактом. Так, например, растворимая форма гибрида белка А с β -галактозидазой быстро деградирует в процессе инкубации клеточного лизата, тогда как в составе тел включения данный гибрид остается интактным [10]. Таким образом, в нашем случае стабильность гибридных белков *in vivo* скорее всего определялась не природой вставки, а уровнем синтеза белка, способствующим образованию тел включения. Использование сильного промотора фага Т7 ведет к высокому уровню экспрессии, что увеличивает тенденцию к внутриклеточной агрегации продуцируемого белка и, как следствие, его стабильности [17, 18]. Тем не менее зеленая флуоресцентная окраска клеток и тел включения в случае GOb1 и GOb2 и ее отсутствие в случае GOb3, говорит о возможном вкладе пептидной вставки в образование нативной конформации GFP в составе гибридного белка.

Несмотря на отсутствие достоверной зависимости стабильности гибридного белка от природы пептидного линкера *in vivo*, на основе данных трипсинолиза гибридных белков *in vitro* можно

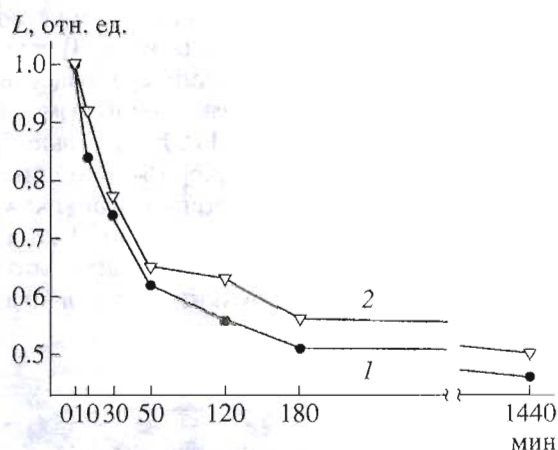


Рис. 2. Изменение люминесценции (L) в процессе трипсинолиза гибридных белков GOb1 (1) и GOb2 (2).

сделать вывод, что аминокислотная последовательность вставки является существенной для сохранения стабильности гибридного белка. Увеличение содержания положительно заряженных аминокислотных остатков (лизин, аргинин) в составе вставки и ее ближайшем окружении ведет к снижению стабильности гибридной молекулы. В то же время введение во вставку инертных к действию протеиназ остатков полярных (треонин, серин) и алифатических аминокислот (аланин, глицин) стабилизирует молекулу. Особый вклад в стабилизацию гибридных белковых конструкций вносит пролин, создающий устойчивые связи -Lys-Pro- и -Arg-Pro- и, помимо этого, препятствующий образованию вторичной структуры, что, вероятно, благоприятно сказывается на последующем сворачивании составляющих гибридный белок модулей.

В нашем случае длина пептидной вставки не оказывала сколько-нибудь заметного влияния ни на стабильность гибридного белка, ни на его функциональные свойства. Хотя, вероятно, в зависимости от природы модулей, составляющих гибридный белок, длина вставки может равнове-

Таблица 2. Содержание полноразмерных гибридных белков GFP-обелин в клетках *E. coli*

Гибридный белок	Содержание полноразмерного белка, %		
	общее*	в нерастворимой фракции**	в растворимой фракции**
GOb1	66.7	64.1	2.6
GOb2	55.2	49.8	5.4
GOb3	60.5	56.4	4.1

* Данные получены в результате расчета иммуноблотов, представленных на рис. 3 а, б, в (4 ч после индукции).

** Обсчет результатов иммуноблота, представленного на рис. 4.

роятно иметь как положительный, так и отрицательный эффект. Так Прескотт и соавт. [19] показали, что длина полипептидного линкера существенным образом влияет на биосинтез полноразмерных гибридных белков на основе GFP. Гибридные белки, содержащие короткий линкер (5–7 а.о.) инертны к действию эндогенных протеиназ, тогда как гибридные белки с длинными вставками (23–28 а.о.), содержащими остатки аргинина, значительно деградируют. Что касается функциональной актив-

ности, то у некоторых гибридных конструкций, включающих GFP и обладающих короткой вставкой, полностью отсутствовала флуоресцентная активность, свойственная этому белку [11]. Несмотря на то что короткая вставка обеспечивает стабилизацию гибридного белка к действию внутриклеточных протеиназ, полная потеря гибридным белком функциональной активности репортерного модуля делает данную вставку неприемлемой для использования [19]. Потеря биологической активности Arg-репрессора, регулирующего транскрипцию гена *ant* во время литического роста бактериофага P22, в составе гибридного белка Arg-Arg также была связана с укорачиванием линкера [20]. Кроме того, с изменением длины и состава аминокислотного линкера была связана способность данного белка образовывать агрегаты [20].

В заключение хотелось бы отметить, что при создании гибридного белка необходимо учитывать дизайн линкера. Предсказать поведение линкерного пептида (образование упорядоченной структуры) на основе его первичной структуры крайне трудно. Поэтому аминокислотный состав линкера часто определяется интуитивно. Существенную помощь в создании гибкого линкера может оказать программа *Linker*, которая автоматически определяет состав и последовательность аминокислотных остатков, исходя из заданного числа аминокислот в линкере, а также позволяет целенаправленно отбирать пептидные последовательности, лишенные потенциальных участков протеолитического действия [16]. Если присутствие участков протеолитического расщепления в линкере является необходимым условием, то использование генных конструкций, обеспечивающих

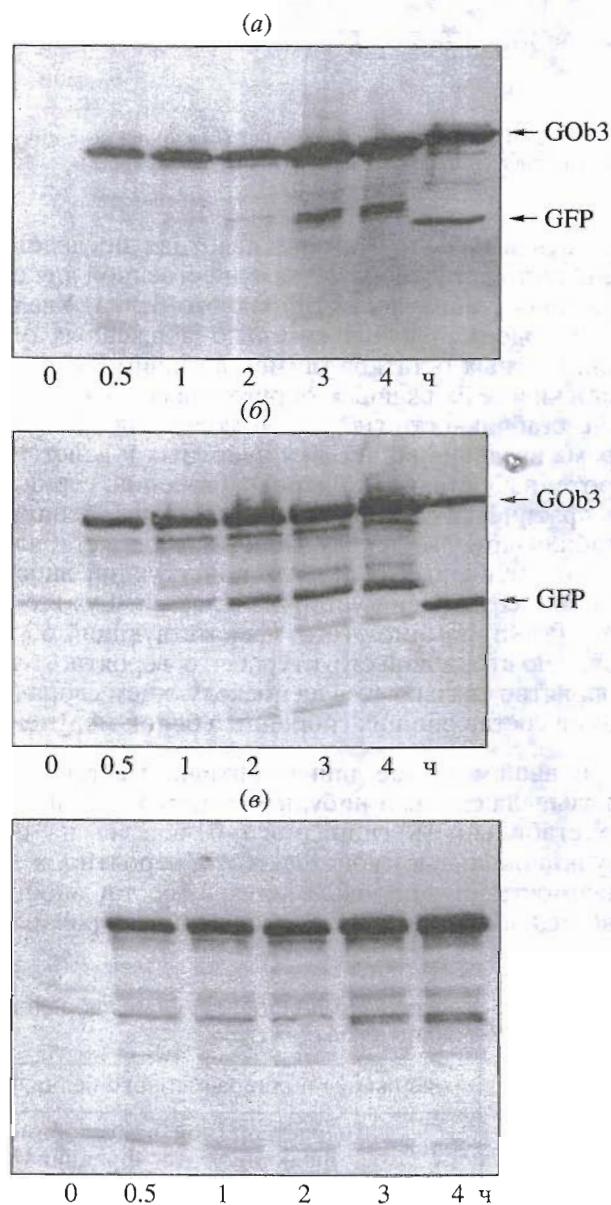


Рис. 3. Иммуноблоттинг суммарных белков лизата клеток с рекомбинантными плазмидами rGOB1 (а), rGOB2 (б), rGOB3 (в), полученных в условиях индукции синтеза гибридных белков и разделенных электрофорезом в градиентном (9–25%) денатурирующем ПААГ. Стрелками указаны положения химерного белка GOB3 и GFP.

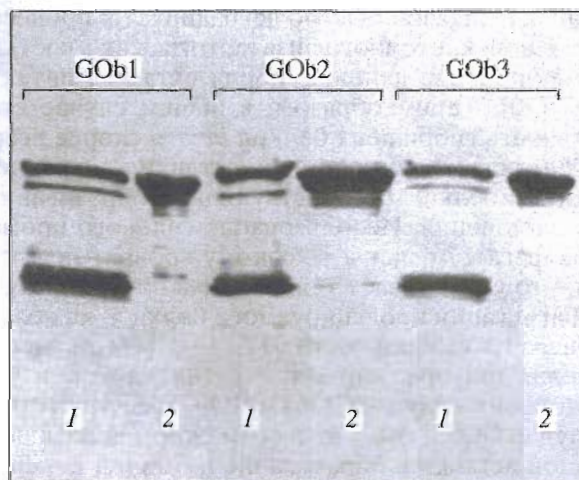


Рис. 4. Иммуноблоттинг гибридных белков, включающих GFP и обелин, полученных из растворимой (1) и нерастворимой (2) клеточных фракций и разделенных электрофорезом в градиентном (9–25%) денатурирующем ПААГ.

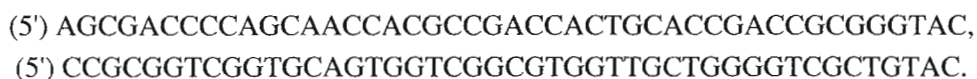
высокий уровень биосинтеза целевого белка, или использование в составе гибрида белков, склонных к агрегации, позволяет нивелировать влияние пептидного линкера на стабильность гибридного белка в процессе его синтеза в клетке. С другой стороны, в некоторых случаях нестабильность гибридных белков, обеспечивающая распад молекулы на функционально активные части, является желательным свойством, и это обстоятельство можно использовать, создавая соответствующие конструкции с учетом структурных особенностей различных частей гибридных белков.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

При выполнении работы использовали Трис, акриламид, *N,N*-метиленбисакриламид, персульфат аммония, TEMED (Merck, Германия); агарозу, dNTP, бромистый этидий, EDTA, Terrific Broth, IPTG, смесь ингибиторов протеиназ, моноклональные антитела против IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США); мочевины, NaCl "ос.ч." (Реахим, Россия); SDS (Serva, Германия); эндонуклеазы рестрикции (Fermentas, Литва); трипсин (КФ 3.4.21.4) (Worthington, США), PMSF (Fluka, Швейцария), Butyl-Toyoparl 650 S (Supelco, США), Superose 12 (Pharmacia, Швеция), целентеразин (Molecular Probes, Нидерланды), нитроцеллюлозную мембрану (BA 83, 0.2 мкм, Schleicher and Schuell, Германия).

Создание генно-инженерных конструкций. Получение рекомбинантных плазмид, содержащих

химерные гены GFP и обелина, проводили в несколько этапов. Вначале ген обелина клонировали в плазмидном векторе pET-11c_{Joe} (получен от проф. Г. Кнакмуса, Германия), представляющем собой модифицированный вектор pET-11c [17], содержащий дополнительные сайты эндонуклеаз рестрикции *KpnI*, *XhoI* и *SaI*. Клонирование проводили по сайтам *KpnI* и *SaI*. Ген обелина амплифицировали с помощью ПЦР, используя праймеры: (5')ttggtaccGGTTCTTCAAAATACGCA и (5')ttgtc-gacTTAGGGAACCTCCGTTGC. В качестве матрицы при амплификации использовали плазмиду pNOV [12], содержащую кДНК обелина (плазида любезно предоставлена Е.С. Высоцким). На следующем этапе в полученную рекомбинантную плазмиду клонировали ген GFP (cycle3 – мутантная форма GFP [11]) по сайтам *NheI* и *KpnI*. Ген GFP амплифицировали с использованием праймеров: (5')atggctagcAAAGGAGAAGAACTTTTC и (5')ttgtc-taccCGGTTTGTAGAGCTCAT. В качестве матрицы для амплификации гена GFP использовали плазмиду pBAD-GFPuv (Clontech, США). В результате была получена экспрессирующая плазида pGOb1, содержащая под контролем промотора фага T7 гены GFP и обелина, находящиеся в единой рамке считывания и разделенные 12-членным нуклеотидным линкером. На заключительном этапе были сконструированы химерные гены GFP–обелин, разделенные удлиненным линкером. С этой целью были синтезированы олигонуклеотиды:



Они были смешаны в эквимольном соотношении, отожжены и клонированы в уникальный сайт *KpnI* плазмиды pGOb1. В результате были получены рекомбинантные плазмиды, в которых гены GFP и обелина разделены вставкой, находящейся в прямой (pGOb2) и обратной (pGOb3) ориентации. Аминокислотные последовательности линкеров представлены в табл. 1.

Продукция гибридных белков в клетках *E. coli*. Трансформированные плазмидами pGOb1, pGOb2 и pGOb3 клетки *E. coli* BL21 (DE3) выращивали в культуральной среде Terrific Broth в присутствии 100 мкг/мл ампицилина до величины поглощения 0.5 ОЕ₅₀₀. Синтез гибридных белков индуцировали добавлением IPTG до конечной концентрации 0.5 мМ. Последующую инкубацию клеток проводили в течение 4 ч при 37°C.

Выделение и очистка гибридных белков. Клетки, содержащие гибридные белки, разрушали ультразвуком в буфере следующего состава: 20 мМ Трис-НСl, рН 7.8, 150 мМ NaCl, 5 мМ EDTA. Раство-

римуую и нерастворимую фракции клеточного лизата разделяли центрифугированием (18000 об/мин в течение 30 мин, ротор JA-21, Beckman J2-21, США). Разрушение клеток проводили при 4°C с добавлением смеси ингибиторов протеаз согласно протоколу изготовителя, а также добавлением PMSF до конечной концентрации 1 мМ.

Фракцию клеточного лизата, осажденную центрифугированием (гельца включения), растворяли в 8 М мочевины, осветляли центрифугированием и добавляли (по каплям) при интенсивном перемешивании к 20 объемам буфера ренатурации, содержащего 10 мМ Трис-НСl, рН 7.8, 2 мМ CaCl₂, 150 мМ NaCl, 2 мМ DTT. Полученный раствор выдерживали в течение ночи при комнатной температуре, а затем осветляли центрифугированием. Супернатант наносили на колонку с Butyl-Toyoparl 650 S, предварительно уравновешенную буфером: 10 мМ Трис-НСl, рН 7.8, 250 мМ NaCl, 5 мМ EDTA, 2 мМ DTT. Элюцию проводили буфером: 10 мМ Трис-НСl, рН 7.8, 250 мМ NaCl,

10 мМ CaCl₂, 2 мМ DTT. Хроматографические фракции, содержащие гибридный белок, объединяли и проводили их гель-фильтрацию на колонке с Superose 12, уравновешенной буфером, содержащим 20 мМ Трис-НСl, рН 7.8, 5 мМ CaCl₂, 500 мМ NaCl, 5 мМ β-меркаптоэтанол. Чистота выделенных белков по данным денатурирующего электрофореза в ПААГ составляла не менее 95%.

Определение функциональной активности модулей, составляющих гибридный белок. Для определения люминесцентной активности обелинового модуля гибридных белков отбирали аликвоту (2–5 мкл) анализируемого раствора и добавляли к 100 мкл активирующего буфера: 50 мМ Трис-НСl, рН 7.1, 500 мМ NaCl, 5 мМ EDTA, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 1 мг/мл BSA, 80 мкМ целентеразина. Полученную смесь инкубировали в течение ночи при температуре 4°C. 1–5 мкл смеси переносили в кювету биолюцинометра (Наука БЛМ 8802, Красноярск), уже содержащую 200 мкл буфера: 100 мМ Трис-НСl, рН 8.8, 10 мМ EDTA. Люминесценцию инициировали добавлением 50 мкл 200 мМ CaCl₂.

Флуоресцентную активность зеленого флуоресцентного белка определяли на спектрофлуориметре (Jasco 821 FP, Япония) при длинах волн возбуждения 395 и испускания 510 нм.

Ограниченный протеолиз гибридных белков трипсином проводили при соотношении фермента и субстрата 1 : 25 (по весу) при температуре 4°C в буферном растворе: 20 мМ Трис-НСl, рН 7.8, 5 мМ CaCl₂, 500 мМ NaCl, 5 мМ β-меркаптоэтанол. Останавливали протеолиз через 10, 30, 60, 120, 180 и 1440 мин добавлением буфера Лэммли [21] и прогреванием образцов в течение 2 мин при 90°C.

Иммуноблоттинг. Синтез белков в клетках, выращенных при 37°C до оптического поглощения 0.5 ОЕ₅₀₀, индуцировали добавлением IPTG до конечной концентрации 0.5 мМ. Дальнейшее культивирование продолжали при 25°C. Аликвоты клеточной суспензии (0.07 ОЕ₅₀₀) отбирали через 0.5, 1, 2, 3 и 4 ч после начала индукции, осаждали центрифугированием, суспендировали в буфере Лэммли, прогревали в течение 2 мин при 90°C, и полученный таким образом лизат подвергали электрофоретическому разделению в градиентном (9–25%) ПААГ. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану электроблоттингом с использованием прибора SEMI-PHOR TE70 (Hoefer scientific instruments, США) при 0.8 мА/см² в течение 90 мин. Нитроцеллюлозную мембрану последовательно обрабатывали, выдерживая в растворах следующего состава:

1) 1% BSA в буфере TBS (20 мМ Трис-НСl, рН 7.4, 150 мМ NaCl) в течение 30 мин при комнатной температуре;

2) кроличьими поликлональными антителами против GFP (20 мкг/мл) в буфере TBS с 0.1% Твин-20 в течение 1 ч при 37°C;

3) антителами против IgG кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена в разведении 1 : 1000 в TBS с 0.1% Твин-20 в течение 45 мин при 37°C.

После каждой обработки нитроцеллюлозную мембрану отмывали не менее пяти раз буфером TBS, 0.1% Твин-20. Нитроцеллюлозную мембрану окрашивали 0.04% хлорнафтолом.

Количественный анализ иммуноблотов. Иммуноблоты переводили в цифровую форму сканированием на OpticPro 9630P (Plustek, США). Графический профиль окрашенных полос получали с помощью программы Scion Image (<http://www.scioncorp.com>). Дальнейший расчет площадей пиков проводили в программе Microcal Origin (<http://www.microcal.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Baneux F., Georgiou G.* // Stability of Protein Pharmaceuticals. A. Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation /Eds T.J. Ahern, M.C. Manning. New York: Plenum Press, 1992. P. 69–108.
2. *Enfors S.-O.* // Trends Biotechnol. 1992. V. 10. P. 310–315.
3. *Murby M., Uhlen M., Stahl S.* // Protein Expression Purif. 1996. V. 7. P. 129–136.
4. *Talmadge K., Gilbert W.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. P. 1830–1833.
5. *Hammarberg B., Nygren P.-A., Holmgren E., Elmlad A., Tally M., Hellman U., Moks T., Uhlen M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 4367–4371.
6. *Gottesman S.* // Methods Enzymol. 1990. V. 185. P. 119–129.
7. *Sato K., Sato M.H., Yamaguchi A., Yoshida M.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994. V. 202. P. 258–264.
8. *Wall J.G., Pluckthun A.* // Curr. Opin. Biotechnol. 1995. V. 6. P. 507–516.
9. *Cheshyre J.A., Hipkiss A.R.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1989. V. 31. P. 158–162.
10. *Hellebust H., Murby M., Abrahmsen L., Uhlen M., Enfors S.-O.* // Bio/Technology 1989. V. 7. P. 165–168.
11. *Tsien R.Y.* // Annu. Rev. Biochem. 1998. V. 67. P. 509–544.
12. *Matveev S.V., Illarionov B.A., Vysotsky E.S., Bondar V.S., Markova S.V., Alakhov Y.B.* // Anal. Biochemistry. 1995. V. 231. P. 34–39.
13. *Ohmiya Y., Hirano T.* // Chemistry and Biology. 1996. V. 3. P. 337–347.
14. *Tsuji F.I., Ohmiya Y., Fagan T.F.* // Photochemistry and Photobiology. 1995. V. 62. P. 657–661.

15. Бондарь В.С., Трофимов К.П., Высоцкий Е.С. // Биохимия. 1992. Т. 57. С. 1481–1490.
16. Crasto C.J., Feng J. // Protein Engineering. 2000. V. 13. P. 309–312.
17. Studier F.W., Rosenberg A.H., Dunn J.J., Dubendorff J.W. // Methods Enzymol. 1990. V. 185. P. 60–89.
18. Cheng Y.-S.E., Kwoh D.Y., Kwoh T.J., Soltvedt B.C., Zipser D. // Gene. 1981. V. 14. P. 121–130.
19. Prescott M., Nowakowski S., Nagley P., Devenish R.J. // Analytical Biochemistry. 1999. V. 273. P. 305–307.
20. Robinson C.R., Sauer R.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 5929–5934.
21. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

The Dependence of Stability of the Green Fluorescent Protein–Obelin Hybrids on the Nature of Their Constituent Modules and the Structure of the Amino Acid Linker

V. S. Skosyrev*, A. Yu. Gorokhovatsky*, L. M. Vinokurov*, N. V. Rudenko*,
T. V. Ivashina**, V. N. Ksenzenko***, and Yu. B. Alakhov*#

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino Branch, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

**Skraybin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

***Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

Recombinant plasmids containing genes for the green fluorescent protein (GFP) from *Aequorea victoria* and the photoprotein obelin from *Obelia longissima* linked in-frame by inserts differing in nucleotide sequences were constructed. The expression of the chimeric genes in *Escherichia coli* cells resulted in synthesis of the GFP–obelin hybrid proteins. These proteins were purified to homogeneity and subjected to limited trypsinolysis. It was shown that the resistance of GFP–obelin hybrid proteins to trypsin depends on the nature of their constituent modules and the amino acid sequences of linkers between the modules. The kinetics of accumulation of full-length hybrid proteins during the growth of bacterial cells does not depend on the structure of the peptide linkers. Most of the full-length product accumulates in cells in the form of inclusion bodies resistant to endogenous proteases. The soluble fraction of the protein undergoes considerable proteolysis regardless of the linker structure. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: hybrid proteins, peptide insert, stability; green fluorescent protein; obelin

To whom correspondence should be addressed; phone +7 (0967) 79-0537; e-mail: alakhov@fibkh.serpukhov.su.