

УДК 577.112.083

НОВЫЙ Ni^{2+} -АФФИННЫЙ ВАРИАНТ eGFP СО СВОБОДНЫМИ С- И N-КОНЦАМИ

© 2023 г. А. Г. Тарабарова¹, *, М. С. Юркова¹, А. Н. Федоров¹

¹ Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: tarabarovan@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.06.2023 г.

После доработки 30.06.2023 г.

Принята к публикации 06.07.2023 г.

Работа посвящена получению зеленого флуоресцентного белка eGFP с Гис-меткой, введенной в состав полипептидной цепи. В результате получен белок eGFP157_7Н со встроенной Гис-меткой и свободными N- и С-концами для последующего получения слитых белков. Добавленная Гис-метка позволит проводить очистку конструкций с eGFP методом металл-хелатной аффинной хроматографии в нативных условиях. Полученный вариант eGFP157_7Н сохранил флуоресцентные свойства полностью соответствующими исходному варианту eGFP.

Ключевые слова: eGFP, Гис-метка, металл-аффинная очистка eGFP

DOI: 10.31857/S0555109923060193, **EDN:** CXYUQZ

Зеленый флуоресцентный белок (GFP) широко используется в качестве референсного белка благодаря своим флуоресцентным свойствам. Фьюжн-конструкции с участием GFP создают для отслеживания местоположения исследуемого белка в клетке [1–3], внутриклеточного значения pH [4] и изучения белок-белковых [5, 6] и РНК-белковых взаимодействий [7]. В настоящее время белок широко используется в качестве светящейся метки в клеточной и молекулярной биологии для изучения экспрессии клеточных белков. Разработаны модификации белка для применения в биосенсорах.

Однако GFP, в отличие от других успешно используемых белков-лидеров в слитых конструкциях, таких, как полипептидные последовательности A, Z, ABP, GST, поли-His, MBP, FLAG, Pim-Point [8], не является аффинной меткой, в связи с чем очистка конструкций с участием GFP может представлять существенные затруднения. Одно из решений задачи выделения рекомбинантных белков заключается в присоединении к ним какой-либо аффинной метки, из которых наиболее употребимой является метка из нескольких остатков гистидина [9]. Полигистидиновая метка способна взаимодействовать с ионами двухвалентных металлов Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} [10], что придает белку аффинность к смоле с иммобилизованными ионами двухвалентных металлов, например, Ni^{2+} . Преимущество использования металл-хелатной аффинной хроматографии за-

ключается в небольших размерах самих пептидов, придающих сродство к ионам металлов, а также в том, что данный вид аффинной хроматографии проводится в мягких физиологических условиях, что особенно важно при работе с белками.

В уже ставшем классическим подходе использования гистидиновых меток рассматривается присоединение шести или более расположенных подряд остатков гистидина к N- или С-концу белка: для этих случаев эмпирически подобранным оптимальным вариантом является метка 6Н [11]. Увеличение числа остатков гистидина может приводить к незначительному снижению равновесной K_D , но не к ее повышению, а вот уменьшение числа остатков приводит к значительному снижению сродства к Ni^{2+} [11].

Включение Гис-метки в составе полипептидной цепи белка позволит использовать такой белок абсолютно так же, как и его исходный вариант, то есть сохранив возможность присоединять белки как к N-, так и С-концу фьюжн-партнера, и при этом полностью использовать свойства аффинной метки, избегая стерических затруднений.

Новая стратегия использования Гис-меток в составе полипептидной цепи чаще всего применяется для очистки и концентрации вирусных векторов с целью их дальнейшего использования при вакцинации или же генной терапии [12]. Примером может служить встраивание гексагистидиновой (6Н) метки, экспонированной на поверхности капсида, в капсидный белок gp64 баку-

ловируса [13] или вируса простого герпеса 1-го типа [14], который используют для разработки терапии заболеваний нервной системы. Аналогичный подход также использовали для белков капсида вируса ящура [15], ретровируса [16], вируса гриппа типа А [17] и лентивирусных векторов [18], сенекавируса [19].

Включение Гис-метки в состав полипептидной цепи возможно не только для капсидных белков вирусных векторов, но и для белков с иными функциями. Например, в работе [20] описывается вариант модификации белка путем включения 6Н метки внутрь петли термосомы организма *T. Acidophilum*. Метка не только не нарушила структуру белка, но и способствовала его выделению при помощи металл-аффинной хроматографии.

Таким образом, 6Н метка — это универсальный инструмент, который можно использовать на разных белках и для решения различных задач: от выделения и очистки белка до его детектирования *in vitro* и *in vivo*. Однако в некоторых случаях использование 6Н метки как на С- или N-конце, так и при встраивании в полипептидную цепь, влияет на структуру или функции модифицированного белка. Таким образом, выбор места введения метки, а также конфигурации самой метки, может иметь решающее значение для функционирования полученной конструкции.

Цель работы — разработка варианта GFP, получившего аффинность к металл-хелатной смоле и при этом сохранившего свободные N- и С-концы, а также функцию флуоресценции.

МЕТОДИКА

Введение Гис-метки. Для получения плазмиды pET15b_eGFP в качестве матрицы для клонирования гена eGFP использовали плазмиду eGFP-N1. Клонирование гена осуществляли методом ПЦР с использованием ДНК-полимеразы Q5 (“NEB”, Великобритания) на амплификаторе C1000 Touch (“Bio-Rad”, США) по стандартному протоколу со следующими праймерами (“Евроген”, Россия): NcoI_eGFP_IG: 5'TTTTCCATGGTGAGCAAGGGCGAGG3'; BamHI_eGFP_IG: 5'TTTTGTGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG3'.

Полученный ген клонировали в экспрессионный вектор pET15b по сайтам NcoI и BamHI. Реакции рестрикции и лигирования проводили по инструкциям стандартных протоколов.

Для получения плазмид pET15b_eGFP157_3H3G3H и pET15b_eGFP157_7H использовали метод сайт-направленного мутагенеза с некоторыми изменениями [10]. Для внесения вставок использовали следующие праймеры (Евроген, Россия): для внесения вставки 3H3G3H прямой F_gfp157_3H3G3H: 5'CATGGCCGACAAGCAGCATCATCATGGTGGTGGTTCATCA-

TCATAAGAACGGCATCAAGG3' и обратный R_gfp157_3H3G3H: 5'CCTTGATGCCGTTCTTATGATGATGACCACCACCATGATGATGCTGCTTGTCCGCCATG3'; для внесения вставки 7H прямой F_gfp157_7H: 5'CATGGCCGACAAGCAGCATCATCATCATCATCATCACAAGAACGGCATCAAGG3' и обратный R_gfp157_7H: 5'CCTTGATGCCGTTCTTGTGATGATGATGATGATGATGCTGCTTGTCCGCCATG3'.

В отличие от классического протокола сайт-направленного мутагенеза, в стандартную реакционную смесь для ПЦР с Q5 ДНК-полимеразой добавляли один из праймеров, либо F_gfp_157, либо R_gfp_157. В качестве матрицы использовали 100 нг плазмиды pET15b_eGFP. Температура отжига для F_gfp_157 составила 65°C, а для R_gfp_157 — 72°C.

После ПЦР реакционные смеси с праймерами F_gfp_157 и R_gfp_157 объединяли в соотношении 1 : 1 и проводили денатурацию и отжиг комплементарных цепей ДНК.

Для удаления матричной ДНК полученную смесь плазмид обрабатывали ферментом DpnI (ThermoFisher, США) по стандартному протоколу при 37°C в течение 16 ч. Полученной плазмидной ДНК трансформировали приготовленные по стандартному протоколу Ca²⁺-компетентные клетки DH5α и далее отбирали положительные клоны стандартным методом ПЦР с колоний.

Последовательность полученных конструкций была подтверждена секвенированием по методу Сэнгера (“Евроген”, Россия).

Экспрессия генов целевых белков. Для получения целевых белков использовали систему экспрессии на основе РНК-полимеразы фага Т7 в бактериях *E. coli* штамма ArcticExpress(DE3) (“Agilent”, США). Для этого одиночный клон с чашки Петри инокулировали в питательную среду LB объемом 5 мл с антибиотиками ампициллином (100 мкг/мл) и гентамицином (20 мкг/мл). Клетки оставляли расти в шейкерах-инкубаторах при 37°C со скоростью перемешивания в 250 об./мин в течение 16 ч. Полученную ночную культуру инокулировали в соотношении 1 : 100 в 500 мл среды ТВ, содержащей те же антибиотики, и инкубировали при 37°C и 250 об./мин в течение 3 ч до достижения оптической плотности (λ 600) 0.6–0.8 о.е./мл. Далее вносили индуктор экспрессии ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ, после чего понижали температуру инкубации до 10°C и продолжали культивирование в течение 24 ч, а затем температуру понижали до 4°C и инкубировали культуру еще 12 ч. После завершения культивирования клетки отделяли от жидкой среды центрифугированием при 1500 g и 4°C в течение 20 мин.

Уровень продукции целевых белков оценивали, проводя электрофорез в 12.5%-ном ПААГ в денатурирующих условиях в присутствии доде-

цил-сульфата натрия (ДДС-Na). Полученную биомассу замораживали и хранили при -20°C .

Выделение и очистка целевых белков. Биомассу штамма-продуцента ресуспендировали в 50 мМ натрий-фосфатного буфера pH 7.5 с добавлением 1 мМ фенилметилсульфонил фторида, ингибитора сериновых протеаз, и разрушали ультразвуковым дезинтергратором Q500 Sonicator® на льду. Далее супернатант отделяли от дебриса центрифугированием при 9800 g в течение 30 мин при 4°C .

Хроматографическую очистку целевых белков из супернатанта проводили в несколько этапов. Очистку eGFP проводили на 1 мл колонке с анионообменной смолой HiTrap Q-сефарозой в 50 мМ натрий-фосфатном буфере pH 7.5. Элюировали линейным градиентом NaCl от 0 до 500 мМ на первом этапе и от 100 до 500 мМ при рехромаатографии.

При очистке конструкторов eGFP157_3H3G3H и eGFP157_7H первую хроматографию проводили на той же смоле в тех же условиях. Элюировали линейным градиентом NaCl от 0 до 500 мМ. Вторую хроматографию проводили на металл-аффинной смоле HisTrap HP в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7.5, с 100 мМ NaCl. Колонку со связавшимся белком промывали 1 М NaCl в том же буфере. Элюировали белки линейным градиентом имидазола от 20 до 500 мМ.

Для перевода белка в другой буфер перед следующим этапом очистки или же для дальнейших исследований использовали диализ. Фракции, содержавшие целевой белок, объединяли и концентрировали при помощи металл-хелатной смолы с ионами Ni^{2+} .

Наличие примесей нуклеиновых кислот в белковых препаратах контролировали спектрофотометрически при длине волны 260 нм.

Установление времени удерживания на смоле. Для определения времени удерживания белков eGFP157_7H и eGFP157_3H3G3H на смоле хроматографические фракции исследовали при помощи электрофоретического разделения в денатурирующих условиях в присутствии ДДС-Na. Для фракции с наибольшим содержанием целевого белка рассчитывали время от начала элюции до времени выхода половины этой фракции. Для этих же фракций устанавливали концентрацию имидазола, при которой происходит элюция. Характеристика колонки и потока: 1 мл, "HisTrap HP" ("Cytiva", Германия), скорость потока 0.5 мл/мин, объем фракции 0.5 мл, градиент от 0 до 300 мМ имидазола в объеме, равном 15 объемам колонки. Буфер А: 20 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7.4, 250 мМ NaCl, буфер Б: 500 мМ имидазола, 20 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7.4, 250 мМ NaCl.

Определение концентрации белка. Концентрацию белка определяли методом денситометрии

электрофореграмм с помощью программного обеспечения "OnedScan" (Stratagene, США). В качестве стандарта использовали известные концентрации бычьего сывороточного альбумина.

Спектроскопия кругового дихроизма (КД). Исследование вторичной структуры белков проводили с использованием спектроскопии КД на спектрополяриметре "Chirascan" ("Applied Photophysics", Великобритания) в диапазонах длин волн от 180 до 260 нм. Значения молярной эллиптичности $[\theta]$ рассчитывали из уравнения:

$$[\theta] = [\theta]_{\text{изм}} M_{\text{ост}} - LC,$$

в котором $[\theta]_{\text{изм}}$ — измеренная эллиптичность (градусы) и $M_{\text{ост}}$ — средняя молекулярная масса остатка пептида (Да), рассчитанная из его аминокислотной последовательности, L — длина оптического пути кюветы (мм), C — концентрация белка (мг/мл). Измерения проводили в 0.1 мм кювете при концентрации белка 0.2–0.3 мг/мл в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7.5. Полученные значения молярной эллиптичности относительно длины волны анализировали при помощи программного обеспечения DichroWeb [21], чтобы определить количественный состав элементов вторичной структуры белков.

Для сравнения формы спектров делали их нормализацию по минимальным значениям на длине волны 222 нм для белка со спиральными элементами и 218 нм для белка с β -слоями. Полученные формы спектров сравнивали со спектром eGFP исходного типа, который был предсказан по родственной структуре PDB: 6YLQ в программе PDBMD2CD [9].

Измерение спектров эмиссии, вычисление молярного коэффициента экстинкции, квантового выхода флуоресценции и яркости eGFP. Снятие спектров эмиссии флуоресценции выделенных белков eGFP, eGFP157_3H3G3H, eGFP157_7H проводили с использованием спектрофлуориметра "FluoroMax-4" ("Horiba", Япония) в Центре коллективного пользования ФИЦ Биотехнологии РАН. Длина волны возбуждения — 488 нм, размер щели — 5 нм. Спектр эмиссии снимали от 480 до 650 нм при длине волны возбуждения 488 нм. Спектр возбуждения снимали от 380 до 500 нм, при длине волны эмиссии 510 нм. Для сравнения форм спектров пересчитывали полученные значения в относительные единицы.

Для вычисления молярного коэффициента экстинкции хромофора нативного GFP использовали методику, описанную в статье [20].

По полученным значениям молярной концентрации и поглощению нативного белка на длине волны 488 нм построили график зависимости поглощения от молярной концентрации, умноженной на длину оптического пути. Для нахождения молярного коэффициента экстинкции вычисля-

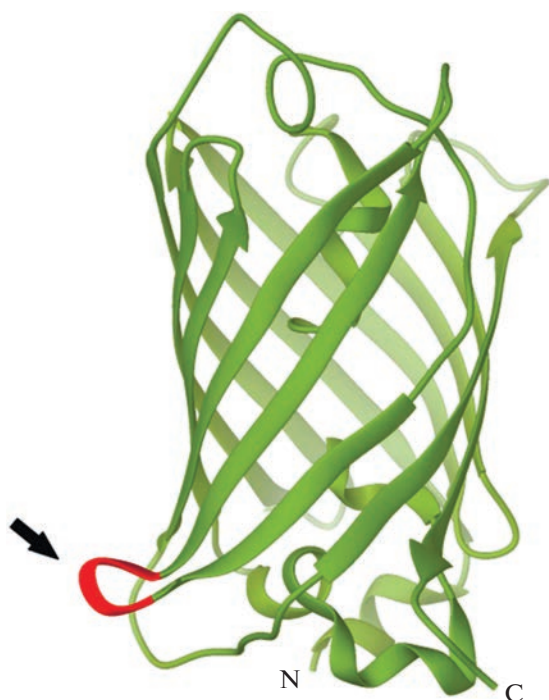


Рис. 1. Положение Гис-меток в исходном варианте eGFP (PDB: 6YLQ). Визуализация пространственной структуры белка в программе UCSF Chimera [31]. Стрелкой показано и выделено красным цветом место вставки Гис-меток между 157Q и 158K.

ли наклон прямой, полученной методом линейной аппроксимации с величиной достоверности >0.9 .

Вычисление относительного квантового выхода флуоресценции проводили по флуоресцеин-йодацетамиду, квантовый выход которого 0.5 ед. Для этого получали спектр поглощения каждого белка при длине волны 488 нм и считали значение площади под кривой. По зависимости значений площади под кривой спектра эмиссии от поглощения на длине волны 488 нм для белков и флуоресцеин-йодацетамида получили наклон прямой, полученной методом линейной аппроксимации с величиной достоверности >0.9 . Полученные результаты сравнили относительно вещества с известным квантовым выходом и по простой пропорции рассчитали относительный квантовый выход флуоресценции для всех вариантов eGFP.

Вычисление яркости флуоресцентных белков проводили по формуле:

$$B = \frac{QYCE}{1000},$$

где B — значение яркости; QY — относительный квантовый выход; CE — молярный коэффициент экстинкции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Место для введения полигистидиновой метки между аминокислотными остатками № 157 и 158 (рис. 1) было выбрано с учетом известных литературных данных о влиянии мутаций на eGFP [25–30] и с учетом анализа опубликованной структуры eGFP (PDB: 6YLQ).

Для встраивания в полипептидную цепь были выбраны и протестированы два варианта Гис-меток: каноническая последовательность из последовательно расположенных остатков гистидина (7Н) и предложенная в настоящей работе неканоническая последовательность, в которой остатки гистидина чередуются с остатками глицина (Н–Н–Н–G–G–G–Н–Н–Н или 3Н3G3Н).

Каноническая последовательность из остатков гистидина обладает определенной степенью ригидности, что может влиять на фолдинг белка при встраивании такой метки именно внутрь полипептидной цепи. Аминокислотные остатки глицина обладают большой конформационной подвижностью, из-за чего они обычно встречаются в начале или конце спиральных элементов вторичной структуры, а также внутри неструктурированных элементов [30]. Введение остатков глицина в состав Гис-метки должно увеличить общую конформационную подвижность предлагаемой неканонической Гис-метки, что может позволить использовать ее внутри петель или поворотов полипептидной цепи без значительного влияния на общую укладку белка, поэтому триплеты из остатков гистидина были разделены остатками глицина.

Создание соответствующих генетических конструкций было проведено с помощью стандартных методов молекулярной биологии (см. Методика), идентичность полученных конструкторов была подтверждена секвенированием. Экспрессию гена исходного eGFP и его вариантов с введенными Гис-метками проводили в экспрессионном штамме *E. coli* ArcticExpress (DE3) при пониженной температуре, чтобы избежать образования телец включения. По окончании экспрессии клетки были лизированы. Распределение целевых белков между растворимой и нерастворимой фракциями было проанализировано методом электрофоретического разделения белков (рис. 2). Формирования телец включения белком eGFP и eGFP с метками 7Н или 3Н3G3Н между 157 и 158 аминокислотными остатками обнаружено не было.

Полученные в растворимой форме целевые белки были очищены хроматографическими методами (см. Методика) и использованы в дальнейшей работе.

Подтверждение взаимодействия Гис-меченных вариантов eGFP с иммобилизованными ионами Ni^{2+} было проведено измерением времени удерживания белков на Ni^{2+} -смоле при одина-

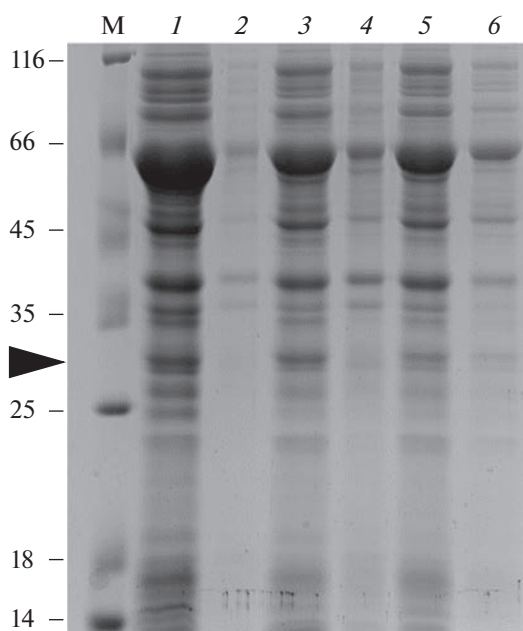


Рис. 2. Электрофореграмма распределения вариантов eGFP между растворимой и нерастворимой фракциями в 12%-ном ПААГ в присутствии ДДС-Na: М – маркер молекулярного веса белков; 1, 3, 5 – супернатант, 2, 4, 6 – осадок; 1 и 2 – eGFP; 3, 4 – eGFP157_3H3G3H; 5, 6 – eGFP157_7H; стрелка указывает положение целевого белка.

ковых условиях проведения хроматографии и в диапазоне концентрации имидазола, необходимой для элюции белка. Факт взаимодействия белка со встроенной в полипептидную цепь Гис-меткой с Ni^{2+} -смолой позволил утверждать, что метка действительно экспонирована к растворителю, а также что нет стерических затруднений между взаимодействием имидазольных радикалов остатков гистидина с иммобилизованным Ni^{2+} . С практической точки зрения, более прочное взаимодействие с металл-аффинной смолой повышает качество хроматографической очистки белка, однако слабые взаимодействия все же позволяют использовать Ni^{2+} -смолу как этап концентрирования белка.

Электрофоретический анализ фракций, полученных в результате элюции конструций eGFP со встроенными Гис-метками (рис. 3) показал, что оба белка способны связываться с Ni^{2+} -содержащей смолой. Однако, в зависимости от олигои-

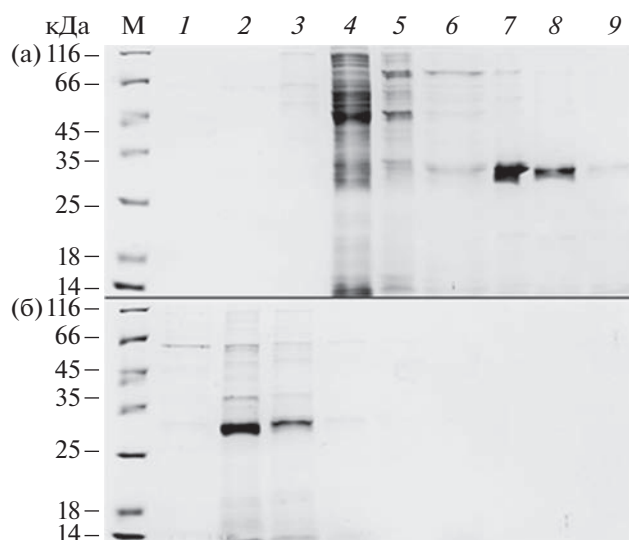


Рис. 3. Электрофореграмма профилей элюции eGFP157_7H (а) и eGFP157_3H3G3H (б) в 12%-ном ПААГ в присутствии ДДС-Na: М – маркер молекулярного веса белков; 1–9 – фракции профиля элюции белка.

стидиновой метки, белки проявляли различную способность удерживаться на аффинной смоле.

Время удерживания eGFP157_7H на Ni^{2+} -смоле было больше, чем eGFP157_3H3G3H, и соответствовало концентрации имидазола 142 ± 14 mM. Более слабое взаимодействие eGFP157_3H3G3H с металл-аффинной смолой не позволило полностью его очистить от неспецифических примесей. Как видно на рис. 3а (дорожки 7 и 8) и рис. 3б (дорожки 2 и 3), очистка eGFP и использовании встроенных Гис-меток 7Н и 3Н3G3Н осуществлялись довольно эффективно. Металл-аффинная хелатная хроматография позволила избавиться от большинства примесных белков. По результатам денситометрии электрофореграммы чистота полученного белка превышала 95%.

Оценку влияния введенных Гис-меток на вторичную структуру белка проводили методом спектроскопии кругового дихроизма (рис. 4). В табл. 1 приведены результаты количественного анализа спектра КД.

Спектры Гис-меченных вариантов eGFP (рис. 4а) были схожи между собой и свидетельствовали о со-

Таблица 1. Результаты количественного анализа спектра КД

Образец		Спираль, %	β -слои, %	Повороты, %	Нерегулярные структуры, %
eGFP	3H3G3H	14 ± 1	34 ± 3	21 ± 2	31 ± 3
	7H	10 ± 1	37 ± 4	21 ± 2	32 ± 3
	wt	10 ± 1	46 ± 5	12 ± 1	32 ± 3

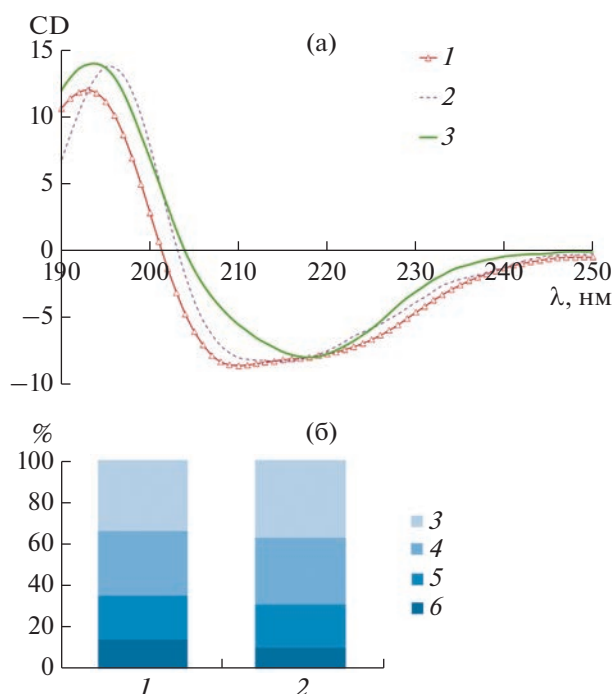


Рис 4. Влияние Гис-меток на вторичную структуру целевых белков: а — наложение экспериментально полученных спектров КД eGFP157_3H3G3N (1) и eGFP157_7N (2) на спектр eGFP (3), рассчитанный при помощи программы PDBMD2CD [24]; б — количественный анализ вторичных элементов спектров КД Гис-меченных вариантов eGFP при помощи программы DichroWeb [21]: 1 — eGFP157_3H3G3N.; 2 — eGFP157_7N.; 3 — нерегулярные структуры, 4 — повороты, 5 — бета-слои, 6 — альфа-спирали.

хранении общей укладки белка. Внесение меток внутрь структуры не приводило к ее денатурации. Тем не менее, наблюдалось отличие спектров от референсного значения. Это отличие можно объяснить увеличением вклада вторичной структуры типа α -спиралей. Количественный анализ спектров на содержание типов вторичных структур (рис. 4б и табл. 1) показал увеличение количества спиральных элементов в спектре образца eGFP157_3H3G3N. В случае eGFP157_3H3G3N увеличение составило 14% по сравнению с 10% у eGFP157_7N. Оба варианта eGFP с введенными Гис-метками сохранили растворимость и приобрели способность взаимодействовать с аффинной смолой, но анализ спектров КД не позволил сделать вывод о полном сохранении функциональности eGFP, поскольку в спектрах изменилось соотношение содержания типов вторичных структур. Для понимания того, как введение меток сказалось непосредственно на флуоресценции eGFP, были получены спектры эмиссии исходного варианта eGFP, eGFP157_7N и eGFP157_3H3G3N. Сравнение формы спектров эмиссии трех экспериментально полученных вариантов eGFP (рис. 5) и

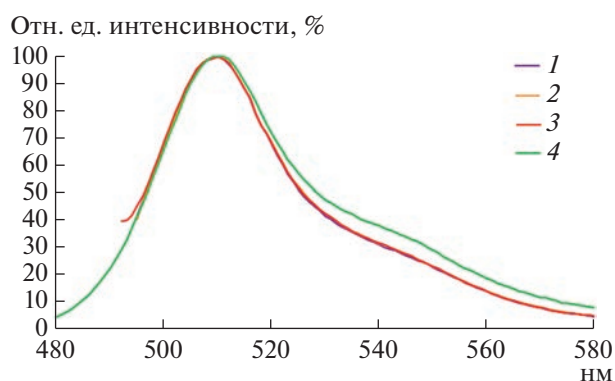


Рис. 5. Сравнение спектров флуоресценции (отн. ед. интенсивности) вариантов eGFP: 1 — спектр eGFP157_3H3G3N, 2 — спектр исходного варианта eGFP, 3 — спектр eGFP157_7N, 4 — спектр, рассчитанный [9] для исходного варианта eGFP.

референсного спектра, рассчитанного по литературным источникам [9], показало, что они идентичны.

Для сравнения яркости eGFP, eGFP157_7N и eGFP157_3H3G3N (рис. 6) были получены значения коэффициентов молярной экстинкции и относительных квантовых выходов (см. Методика), представленные в табл. 2.

Значимое снижение характеристик наблюдалось у варианта eGFP157_3H3G3N. Его яркость составляла 76% от яркости eGFP исходного типа. Яркость варианта с 7Н меткой соответствовала экспериментально рассчитанному уровню яркости исходного варианта eGFP, а также согласовывалась с данными литературы [30].

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы. В результате встраивания метки 3H3G3N в положение между 157 и 158 ами-

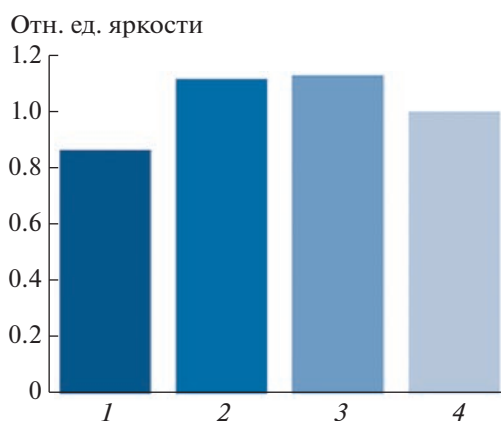


Рис. 6. Сравнение яркости вариантов eGFP: 1 — eGFP157_3H3G3N; 2 — eGFP157_7N; 3 — исходный вариант eGFP; 4 — референсный вариант eGFP, литературные данные [30].

Таблица 2. Характеристика исследуемых вариантов eGFP

Образец	ϵ , М ⁻¹ см ⁻¹	Квантовый выход	Яркость, отн. ед.	Относительная яркость
eGFP157_3H3G3H	47067	0.6	29	0.86
eGFP157_7H	53354	0.7	37	1.11
eGFP	54016	0.7	38	1.13
eGFP [30]	55900	0.6	34	1.00

нокислотными остатками eGFP квантовый выход и коэффициент молярной экстинкции хромофора белка оказались меньше, чем у eGFP исходного типа. При этом аналогичное встраивание 7H метки сохраняло флуоресцентные показатели белка близкими к показателям исходного. Снижение относительного квантового выхода и, как следствие, яркости у варианта eGFP157_3H3G3H могло происходить из-за увеличения конформационной свободы флуорофора [26]. Можно предположить, что использование метки 3H3G3H между 157 и 158 аминокислотными остатками eGFP, вероятно, приводило к некоторой релаксации пространственной структуры, вследствие чего увеличилась подвижность хромофора и снизилась яркость флуоресценции белка. Это может объясняться большей конформационной подвижностью метки 3H3G3H по сравнению с вариантом 7H. Для eGFP157_7H снижения яркости не наблюдалось.

Таким образом, можно заключить, что оба варианта предложенных меток в составе белка eGFP способны связываться с Ni²⁺-смолой, однако метка 7H, вероятно, вызывает меньше структурных и функциональных изменений по сравнению с меткой 3H3G3H. В результате работы был получен вариант eGFP157_7H, имеющий высокое сродство к Ni²⁺-содержащей смоле, со свободными N- и C-концами и сохранявший уровень флуоресценции исходного белка. Этот вариант eGFP можно использовать как инструмент для создания слитых конструкций и решения самых различных исследовательских задач.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках программы по развитию генетических технологий на 2019–2027 годы (Соглашение № 075-15-2021-1071)

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Heger T., Stock C., Laursen M. J., Habeck M., Dieudonné T., Nissen P. In: *Methods in Molecular Biology. Advanced Methods in Structural Biology.* / Ed. Â. Sousa, L. Passarinha. N.Y.: Springer US, 2023. P. 171–186.
- Le Bail A., Schulmeister S., Perroud P.-F., Ntefidou M., Rensing S.A., Kost B. // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 456.
- Xiang X., Li C., Chen X., Dou H., Li Y., Zhang X., Luo Y., Xiang X. // *Methods in Mol. Biol.* 2019. P. 255–269. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9170-9_16
- Nakamura S., Fu N., Kondo K., Wakabayashi K.-I., Hisabori T., Sugiura K. // *J. Biol. Chem.* 2021. V. 296. P. 100134. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.016847>
- Barnard E., Timson D.J. In: *Methods in Molecular Biology. Molecular and Cell Biology Methods for Fungi.* / Ed. A. Sharon. Totowa. N.J.: Humana Press, 2010. V. 638. P. 303–317. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-611-5_23
- Pedelacq J.-D., Waldo G.S., Cabantous S. // *Methods Mol. Biol.* 2019. V. 2025. P. 423–437.
- Alam S.R., Mahadevan M.S., Periasamy A. // *Current Protocols.* 2023. V. 3. P. e689. <https://doi.org/10.1002/cpz1.689>
- Nilsson J., Ståhl S., Lundeberg J., Uhlén M., Nygren P.-åke // *Protein Exp. Purif.* 1997. V. 11. P. 1–16.
- Booth W.T., Schlachter C.R., Pote S., Ussin N., Mank N.J., Klapper V. et al. // *ACS Omega.* 2018. V. 3. P. 760–768.
- Hochuli E. // *J. Chromatogr.* 1988. V. 444. P. 293–302.
- Knecht S., Ricklin D., Eberle A. N., Ernst B. // *J. Mol. Recognit.* 2009. V. 22. P. 270–279. <https://doi.org/10.1002/jmr.941>
- Chung Y.H., Volckaert B.A., Steinmetz N.F. // *Bioconjugate Chem.* 2023. V. 34. P. 269–278.
- Hu Y.-C., Tsai C.-T., Chung Y.-C., Lu J.-T., Hsu J.T.-A. // *Enzyme and Microb. Technol.* 2003. V. 33. P. 445–452.
- Jiang C., Wechuck J.B., Goins W.F., Krisky D.M., Wolfe D., Ataai M.M., Glorioso J.C. // *J. Virology.* 2004. V. 78. № 17. P. 8994–9006. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.17.8994-9006.2004>
- Biswal J.K., Bisht P., Subramaniam S., Ranjan R., Sharma G.K., Pattnaik B. // *Biologicals.* 2015. V. 43. C. 390–398.
- Ye K., Jin S., Ataai M.M., Schultz J.S., Ibeh J. // *J. Virology.* 2004. V. 78. P. 9820–9827.
- Opitz L., Hohlweg J., Reichl U., Wolff M.W. // *J. Virol. Methods.* 2009. V. 161. P. 312–316.
- Cheeks M.C., Kamal N., Sorrell A., Darling D., Farzaneh F., Slater N.K.H. // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. P. 2705–2711.

19. Fan J. Xiao P., Kong D., Liu X., Meng L., An T. et al. // *Vaccines*. 2022. V. 10. P. 170.
<https://doi.org/10.3390/vaccines10020170>
20. Paul D.M., Beuron F., Sessions R.B., Brancaccio A., Bigotti M.G. // *Sci Rep*. V. 6. P. 20696.
<https://doi.org/10.1038/srep20696>
21. Edelheit O., Hanukoglu A., Hanukoglu I. // *BMC Biotechnol*. 2009. V. 9. P. 61.
<https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-61>
22. Miles A.J., Ramalli S.G., Wallace B.A. // *Protein Sci*. 2022. V. 31. P. 37–46.
23. Drew E.D., Janes R.W. // *Nucleic Acids Res*. 2020. V. 48. P. W17–W24.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa296>
24. Mamontova A.V., Shakhov A.M., Lukyanov K.A., Bogdanov A.M. // *Biomolecules*. 2020. V. 10. № 11. P. 1547.
<https://doi.org/10.3390/biom10111547>
25. Arpino J.A.J., Reddington S.C., Halliwell L.M., Rizkallah P.J., Jones D.D. // *Structure*. 2014. V. 22. P. 889–898.
26. Chiang C.-F., Okou D.T., Griffin T.B., Verret C.R., Williams M.N.V. // *Arch. Biochem. Biophys*. 2001. V. 394. P. 229–235.
27. Leibly D.J., Arbing A.M., Pashkov I., DeVore N., Waldo G.S., Terwilliger T.C., Yeates T.O. // *Structure*. 2015. V. 23. P. 1754–1768.
28. Williams D.E., Williams D.E., Dolgoplova E.A., Pellechia P.J., Palukoshka A., Wilson T.J. et al. // *J. Am. Chem. Soc*. 2015. V. 137. P. 2223–2226.
29. Zimmer M. // *Chem. Rev*. 2002. V. 102. P. 759–782.
30. Hovmöller S., Zhou T., Ohlson T. // *Acta Cryst D*. 2002. V. 58. P. 768–776.
31. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. // *J. Comput. Chem*. 2004. V. 25. P. 1605–1612.

New eGFP Mutant with Intact C- and N-Termini and Affinity for Ni²⁺

A. G. Tarabarova^a, *, M. S. Yurkova^a, and A. N. Fedorov^a

^a Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: tarabarovan@yandex.ru

The green fluorescent protein GFP has long been used in research practice as a molecular tool. It is often used as a fusion partner. To create fusion constructs, target molecules are attached to the N- or C-terminus of GFP. On the other hand, the N- or C-termini of GFP required to create fusion constructs are also used to attach affinity tags that is greatly facilitating purification. Simultaneous introduction of affinity tag and GFP to both or the same end of GFP can create steric hindrances both in the process of biosynthetic folding of the construct and in its affinity purification. This work is devoted to the production of GFP with a His-tag introduced into the polypeptide chain. This work resulted in eGFP157_7H protein with an embedded His-tag and free N- and C-termini to create fusion proteins. The added His-tag will allow purification of the construct with GFP by metal-chelated affinity chromatography under native conditions. The resulting eGFP157_7H variant retained the original fluorescent properties completely similar to those of wild-type eGFP.

Keywords GFP, internal His-tag, IMAC, protein purification in native condition