

УДК 577.152.

## ГИБРИДНЫЙ БЕЛОК: ЛЮЦИФЕРАЗА *Luciola mingrelica*–БИОТИН-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН. ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА, ПРИМЕНЕНИЕ

М.И. Кокшаров, Д.В. Смирнова, С.Г. Аббасова, Н.Н. Угарова

(кафедра химической энзимологии, e-mail: nugarova@gmail.com)

Методами генетической инженерии сконструирована плазмида, кодирующая ген гибридного белка, который включает ген термостабильного мутанта люциферазы светляков *Luciola mingrelica* (4TS) и ген, кодирующий 87 С-концевых аминокислотных остатков биотин-связывающего домена *E. coli* (bccp87). Установлено, что при наработке гибридного белка (4TS-bccp) в клетках *E. coli* BL21(DE3) 60% целевого белка образуется в биотинилированной форме. Показано, что каталитические свойства, термостабильность и спектры биолюминесценции гибридного белка близки к свойствам исходной люциферазы. Показана возможность использования комплекса гибридного белка со стрептавидином в иммуноферментном анализе для определения содержания клеток *Salmonella typhimurium* в интервале от  $10^4$  до  $5 \cdot 10^6$  КОЕ/мл.

**Ключевые слова:** люцифераза светляков, *Luciola mingrelica*, гибридный белок, биотин-связывающий домен, клетки *Salmonella typhimurium*, стрептавидин, биотин, моноклональные антитела.

Люцифераза светляков (КФ 1.13.12.7), катализирующая биолюминесцентную реакцию окисления люциферина кислородом воздуха в присутствии АТФ и ионов  $Mg^{2+}$  [1–3] с высоким квантовым выходом [4–5], находит широкое применение как ген-маркер [6–7], а также в АТФ-метрии и “быстрой микробиологии” [8–9]. Идея использования люциферазы в качестве ферментной метки в иммуноферментном анализе (ИФА) привлекательна, однако в течение долгого времени сталкивалась с затруднениями из-за низкой термостабильности и инактивации фермента при попытке его химической модификации. С развитием методов генной инженерии были получены термостабильные мутантные формы люциферазы [10–11]. Широкое распространение получили гибридные белки, в которых к молекуле люциферазы методами генетического конструирования присоединен белковый фрагмент, способный связываться с различными мишенями [12–16]. В настоящее время весьма популярными в ИФА являются методы с использованием высокоаффинных биотин-стрептавидиновых взаимодействий. Биотинилирование люциферазы стало возможным при гибридизации фермента с биотинсвязывающими доменами. Биотинсвязывающие домены содержатся в таких белках, как ацетилкокарбоксилаза и пируваткарбоксилаза, имеющих в активном центре остаток лизина, способный образовывать амидную связь с биотином при помощи биотин-лигазы [17]. Таким образом, био-

тинилирование белков, конъюгированных с биотинсвязывающими доменами, происходит непосредственно при синтезе гибридных белков *in vivo*. В литературе подобные белки описаны для люцифераз светляков *Photinus pyralis* [13–14] и *Luciola lateralis* [15–16]. Для люциферазы светляков *Luciola mingrelica* таких конструкций не описано.

В нашей лаборатории получен и охарактеризован высокоактивный термостабильный мутант люциферазы *Luciola mingrelica* (4TS) [18]. Активность мутанта 4TS по сравнению с ферментом дикого типа составляет 190%, после двух дней инкубации при 37°C уменьшается всего на 20% [18]. Таким образом, данный мутант люциферазы *Luciola mingrelica* соответствует требованиям, которые предъявляются к ферментам-меткам в ИФА.

Цель данной работы – получение и изучение свойств гибридного белка термостабильной мутантной люциферазы *Luciola mingrelica* с биотинсвязывающим доменом (4TS-bccp), а также выяснение возможности его применения для определения содержания клеток *Salmonella typhimurium* с использованием ИФА.

### Материалы и методы

**Использованные вещества и растворы.** В работе использовали аденозин-5'-трифосфат (АТФ), дитиотреитол (ДТТ), бычий сывороточный альбумин

(BCA) (“Sigma”, США), D-люциферин (LH<sub>2</sub>) (“Люмтек”, Россия), олигонуклеотиды (“Синтол”, Россия). Для проведения реакции мутагенеза и клонирования требуемых фрагментов ДНК использовали ферменты: TaqSE ДНК-полимеразу фага (“СибЭнзим”, Россия), Taq ДНК-полимеразу, T4 ДНК-лигазу (“Силекс”, Россия) и ряд рестриктаз фирм “СибЭнзим” (Россия), “Fermentas” (Литва) и “Boehringer Mannheim” (Германия). Для выделения плазмид из клеток *E. coli* и элюции фрагментов ДНК из агарозного геля использовали наборы фирмы “Qiagen” (Германия). Для определения степени биотинилирования использовали магнитные частицы Streptavidin C1 (“Invitrogen”, США). Для проведения иммуноферментного анализа использовали клетки *Salmonella typhimurium* CRIFS № C1058, моноклональные антитела SB:1B10B к сальмонелле серогруппы В, полученные по методу [19], и их биотинилированные производные, стрептавидин (“Sigma”, США).

**Конструирование плазмиды, кодирующей гибридный белок.** Для получения плазмиды, кодирующей гибридный белок, были использованы следующие фрагменты ДНК: ген термостабильного мутанта люциферазы 4TS, выделенный из плазмиды pETL7 [18] при помощи рестрикции по сайтам PstI, ApaI; фрагмент ДНК, кодирующий 87 С-концевых аминокислотных остатков биотинсвязывающего белка (bssr) [17], выделенный из генома клеток *E. coli*, в который были введены сайты рестрикции SalI и ApaI при помощи ПЦР. Для проведения ПЦР были использованы следующие праймеры:

прямой праймер bssr:

5'-TCGGGCCCATTTGGAAGCGCCAGCAGC -3' (26 bp),

обратный праймер bssr:

5'-GTGGTCGACACCSTCGATGACGACCAGCGG-3' (30 bp).

После очистки оба фрагмента лигировали в вектор pET23b (“Novagen”, США), разрезанный по сайтам PstI и XhoI, позволяющий проводить экспрессию целевого белка с помощью высокоэффективной системы рЕТ [20] и добавляющий на С-конце фермента дополнительную шестигистидиновую последовательность для последующей очистки гибридного белка методом металло-хелатной хроматографии. Липкие концы сайтов SalI и XhoI совместимы, и после лигирования оба сайта исчезают. Полученная в результате лигирования плазида была трансформирована в клетки *E. coli* XL1-Blue, наработана и выделена в необходимом для дальнейших исследований количе-

стве. Фермент экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus, выделяли и очищали по методике, описанной в работе [20]. Концентрацию люциферазы определяли по оптической плотности раствора при 280 нм (0,51 ед. опт. пл. соответствует раствору, содержащему 1 мг/мл люциферазы).

**Константы Михаэлиса** определяли на люминометре FB 12 (“Zylux”, США) [20] по величине максимальной интенсивности биолюминесценции при насыщающей концентрации одного из субстратов (1 мМ АТФ или 0,3 мМ LH<sub>2</sub>), варьируя концентрацию другого субстрата в пределах, соответствующих 0,4–7 величин  $K_m$ . Расчет  $K_m$  проводили с помощью программы Origin 7.5 по методу нелинейной регрессии с использованием уравнения Михаэлиса–Ментен.

**Активность люциферазы в составе гибридного белка и комплекса гибридный белок-стрептавидин** измеряли, используя субстратную смесь АТФ–LH<sub>2</sub> следующего состава: фосфатный буферный раствор (рН 7,8, 0,05 М KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,05 М K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>); содержащий 2 мМ АТФ; 0,3 мМ LH<sub>2</sub>; 15 мМ MgSO<sub>4</sub>; 4 мМ ЭДТА; 2% Неонол-10; 0,1 мМ Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. При проведении измерений в люциметрическую микрокювету вносили 100 мкл раствора белка, добавляли 100 мкл субстратной смеси АТФ–LH<sub>2</sub>, быстро перемешивали и измеряли интенсивность биолюминесценции на люминометре “ЛЮМ-1” (“Люмтек”, Россия). Аналогичным способом получали зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации соответствующего белка в широком интервале его концентраций.

**Изучение необратимой термоинактивации люциферазы.** Готовили раствор фермента (0,01 мг/мл,  $1,7 \times 10^{-7}$  М) в охлажденном до 4°C буферном растворе ТВ1 (рН 7,8; 50 мМ трис-ацетат, 20 мМ MgSO<sub>4</sub>; 2 мМ ЭДТА; 0,2 мг/мл BCA), разливали по 50 мкл раствора фермента в 7–8 тонкостенных микропробирок (0,5 мл) и инкубировали в водяном термостате. Через определенные промежутки времени отбирали пробы (по 50 мкл), инкубировали в снегу не менее 15 мин и определяли активность фермента.

**Спектры биолюминесценции** регистрировали на люминесцентном спектрометре “LS 50B” (“Perkin-Elmer”, США) в режиме “биолюминесценция” при ширине щели 10 нм в соответствии с условиями, описанными в [20].

**Степень биотинилирования гибридного белка люциферазы** определяли с использованием сорократного по отношению к концентрации гибридного белка избытка магнитных частиц, модифицированных

стрептавидином в буфере PBS (рН 7,6; 0,01 М Na-фосфат; 0,15 М NaCl). В пробирку типа эппендорф с частицами (0,1 мг) помещали раствор люциферазы (100 мкл), предварительно разбавленный в  $10^5$  раз в буфере PBS, содержащем БСА (0,1 мг/мл), довели до концентрации  $6 \times 10^{-5}$  мг/мл (или  $10^{-9}$  М) и инкубировали в течение 40 мин при интенсивном перемешивании на орбитальном шейкере “Multi Bio RS-24” (“Biosan”, Латвия). Затем измеряли активность люциферазы в контрольном образце (без частиц) и в супернатанте после отделения магнитных частиц магнитом. Для определения неспецифического связывания гибридного белка полученный осадок магнитных частиц дважды промывали 100 мкл буфера PBS, затем добавляли 100 мкл того же буфера и инкубировали 40 мин при комнатной температуре и интенсивном перемешивании. Затем собирали частицы магнитом. В супернатанте измеряли активность люциферазы с использованием субстратной смеси АТФ–LН<sub>2</sub>, как описано выше. Параллельно проводили аналогичный эксперимент с использованием исходной (небиотинилированной) люциферазы.

**Влияние стрептавида и антител на активность гибридного белка** изучали, получая зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации раствора гибридного белка или раствора, содержащего комплекс гибридный белок–стрептавидин (при соотношении компонентов 1:1) с использованием субстратной смеси АТФ–LН<sub>2</sub>, описанной выше. Эти же зависимости использовали для определения предела обнаружения люциферазы. Для изучения влияния антител на активность комплекса гибридный белок–стрептавидин готовили растворы антител с концентрацией от  $10^{-10}$  до  $10^{-7}$  М в буфере PBS. По 50 мкл раствора антител помещали в микроюветы, добавляли по 50 мкл  $10^{-10}$  М раствора комплекса гибридный белок–стрептавидин и инкубировали в течение 1 ч при 37°C и перемешивании в термостатируемой качалке “ES-20” (“Biosan”, Латвия), 250 об/мин. Затем в микроюветы добавляли по 100 мкл субстратной смеси АТФ–LН<sub>2</sub> и измеряли активность фермента на люминометре ЛЮМ-1.

**Получение комплекса гибридный белок–стрептавидин.** Готовили растворы стрептавида с концентрацией  $4 \times 10^{-8}$ ,  $2 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-8}$  М и раствор гибридного белка с концентрацией  $2 \cdot 10^{-8}$  М в 1%-м буфере PBST-БСА (рН 7,6; 0,01 М Na-фосфат; 0,15 М NaCl; 0,1% Tween-20; 1% БСА). Смешивали равные объемы растворов белка и стрептавида и инкубировали от 30 до 140 мин (37°C, 250 об/мин), разбавляли в необ-

ходимое количество раз и использовали в дальнейших экспериментах.

**Взаимодействие комплекса гибридный белок–стрептавидин с иммобилизованными антителами.** Для иммобилизации антител в лунки полистирольного 96-луночного планшета вносили по 100 мкл на лунку раствора биотинилированных антител (5 мкг/мл в 50 mM бикарбонатном буфере, рН 9,6), инкубировали 2 ч (37°C, 250 об/мин), затем 4 раза лунки промывали порциями по 200 мкл буфера PBST (рН 7,6; 0,01 М Na-фосфат; 0,15 М NaCl; 0,1% Твин-20). Для блокирования центров неспецифического связывания на поверхности в лунки вносили по 200 мкл 1%-го раствора БСА, инкубировали в течение 2 ч при 37°C, затем промывали 3 раза по 200 мкл PBST. В подготовленные таким образом лунки планшета с иммобилизованными биотинилированными антителами вносили по 100 мкл раствора комплекса гибридный белок–стрептавидин, инкубировали 1 ч (37°C, 250 об/мин) и не связавшийся с антителами комплекс удаляли пятикратным промыванием планшета 200 мкл раствора PBST. После удаления остатков буфера PBST в ячейки вносили по 50 мкл буфера PBS и по 50 мкл субстратной смеси АТФ–LН<sub>2</sub>, перемешивали и измеряли биолюминесцентный сигнал.

**Получение биомассы инактивированных клеток сальмонелл.** Клетки *Salmonella typhimurium* рассевали на чашку Петри с агаризованной средой LB с помощью стерильной петли и инкубировали при 37°C в течение ночи в термостате. Далее инокулировали двумя индивидуальными колониями в два матраса на 200 мл, содержащих по 60 мл питательной среды LB, и инкубировали в течение ночи (~14 ч) на термостатируемой качалке (37°C, 160–180 об/мин). Для определения количества выросших микроорганизмов отбирали 50 мкл обогащенной среды и производили последовательные разбавления в  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  раз. Аликвоты (100 мкл) образцов с разбавлением в  $10^6$ ,  $10^7$  раз высевали на питательную агаризованную среду LB, инкубировали в течение ночи при 37°C и затем проводили подсчет выросших колоний. Содержимое матрасов переносили в стаканы для центрифугирования (250 мл) и центрифугировали (20 мин, 6000 об/мин, 4°C). Осадок ресуспендировали в 30 мл буфера PBS и переносили в пробирку на 50 мл. Для инактивации клеток пробирку с биомассой нагревали на водяной бане (1 ч, 100°C). Для проверки полноты инактивации клеток сальмонелл 200 мкл суспензии клеток наносили на чашку Петри с питательной средой LB, инкубировали в течение



ночи, после чего определяли количество выросших колоний. Полученный препарат клеток хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Гетерогенный сэндвич-анализ для количественного определения содержания клеток *Salmonella typhimurium*.** Небиотинилированные моноклональные антитела иммобилизовали на поверхности лунок полистирольного планшета, как описано выше для биотинилированных антител. Готовили серию последовательных разведений буфером PBS исходной суспензии клеток ( $10^8$  КОЕ/мл в PBS) с концентрациями клеток от  $10^7$  до  $10^3$  КОЕ/мл. По 100 мкл полученных растворов вносили в лунки планшета и инкубировали в течение 2 ч ( $37^{\circ}\text{C}$ , 250 об/мин). Планшеты с иммобилизованными клетками три раза промывали 200 мкл PBST. Затем в лунки с иммобилизованными клетками вносили по 100 мкл раствора биотинилированных антител (5 мкг/мл в PBST), инкубировали 1,5 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ , 250 об/мин и не связавшиеся антитела удаляли промыванием (4 раза, по 200 мкл буфера PBST). После удаления остатков буфера в лунки планшета вносили по 100 мкл раствора комплекса гибридный белок–стрептавидин с концентрацией  $10^{-8}$  М и инкубировали 1 ч ( $37^{\circ}\text{C}$ , 250 об/мин). Не связавшийся комплекс удаляли пятикратным промыванием планшета 200 мкл PBST. После удаления остатков буфера в лунки вносили по 50 мкл буфера PBS и 50 мкл субстратной смеси АТФ- $\text{LN}_2$  и измеряли интенсивность биолюминесценции на люминометре ЛЮМ-1.

## Результаты и обсуждение

**Получение гибридного белка люцифераза-биотинсвязывающий домен.** Схематическая структура сконструированной нами плазмиды pETL7-bccp, кодирующей гибридный белок (люцифераза–биотинсвязывающий домен), показана на рис. 1.

Плазмида содержит ген термостабильного мутанта 4TS люциферазы светляков *L. mingrelica*, ген, кодирующий 87 С-концевых аминокислотных остатков биотинсвязывающего домена (bccp87) *E. coli*, которые достаточны для биотинилирования гибридного белка *in vivo*, и полигистидиновую последовательность, позволяющую проводить очистку белка с использованием метода металло-хелатной хроматографии. При конструировании гибридного белка стартовый кодон метионина в начале гена bccp87 был изменен на лейцин, чтобы удалить возможную рамку считывания.

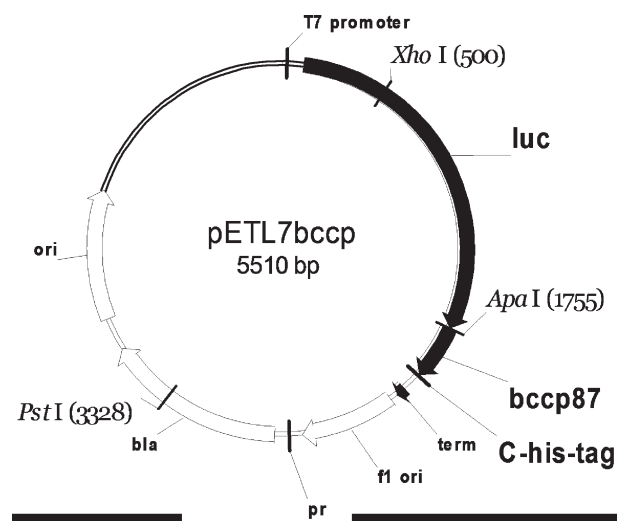


Рис. 1. Схематический рисунок плазмиды, кодирующей ген гибридного белка люцифераза–биотинсвязывающий домен

Этот остаток находится в неконсервативной подвижной петле до начала структурированной части bccp87, поэтому его замена не оказывает существенного влияния на свойства белка [21]. Следует отметить, что в полученной конструкции последовательность SGPLEARAAAEISG выполняет роль подвижного линкера между структурированными частями люциферазы и белка bccp87.

Для определения степени биотинилирования гибридного белка использовали избыток магнитных частиц, модифицированных стрептавидином. При этом с частицами связалось около 60% гибридного белка, а неспецифическая сорбция составила не более 1%. Исходная люцифераза, не содержащая bccp-домена, как мы показали, не связывается с магнитными частицами. В итоге, если предположить, что гибридный белок удерживается магнитными частицами за счет биотин-стрептавидиновых взаимодействий, то биотинилирование гибридного белка составляет  $60 \pm 5\%$ . В данном случае наблюдается неполное биотинилирование, поскольку выращивание клеток велось без добавления экзогенного биотина.

**Влияние биотинсвязывающего домена на свойства гибридного белка.** Для гибридного белка был снят спектр биолюминесценции, измерены константы Михаэлиса по каждому из субстратов, была изучена кинетика термоинактивации при  $47^{\circ}\text{C}$ . Сравнение полученных результатов с данными для мутанта 4TS (таблица) показывает, что биотинсвязывающий домен не оказывает влияния на структуру и окружение ак-

**Физико-химические свойства мутанта 4TS люциферазы светляков *Luciola mingrelica* и гибридного белка: люцифераза (4TS)–биотинсвязывающий белок (бссп)**

Фермент	$K_m$ , мкМ		Максимум спектра биолюминесценции, нм	Время полуинактивации при 47°, мин
	LH <sub>2</sub>	АТФ		
4TS	60 ± 5	41 ± 8	573	15 ± 2
4TS-бссп	66 ± 6	41 ± 7	569	15 ± 2

тивного центра, а также на константы Михаэлиса и термостабильность люциферазы.

**Использование гибридного белка в качестве метки в ИФА для детекции клеток *Salmonella typhimurium*.** В работе мы использовали схему ИФА, показанную на рис. 2. Как следует из рис. 2, интенсивность биолюминесценции измеряется для сложного комплекса, фиксированного на поверхности лунок планшета. Важно было выяснить, какое влияние оказывают компоненты детектируемого комплекса на активность люциферазы. Для изучения влияния стрептавидина на биолюминесцентную активность гибридного белка были получены зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации гибридного белка в интервале от 0,1 до 10 пМ в отсутствие (рис. 3, 1) и в присутствии стрептавидина (рис. 3, 2) при соотношении компонентов 1:1. Эти зависимости

являются линейными, практически совпадают и описываются уравнениями:

$$A = (25 \pm 18) + (515 \pm 9) c, \quad A = (30 \pm 26) + (521 \pm 13) c,$$

где  $A$  – интенсивность биолюминесценции (усл.ед.),  
 $c$  – концентрация белка (пМ).

Из этих уравнений следует, что предел обнаружения гибридного белка и его комплекса со стрептавидином ( $c_{\text{мин}}$ ), рассчитанный по формуле  $c_{\text{мин}} = 3 s_0/S$ , где  $s_0$  – стандартное отклонение фонового сигнала,  $S$  – тангенс угла наклона градуировочной прямой, составляет 0,1 пМ. Было также показано, что присутствие антител в концентрации от  $10^{-7}$  до  $10^{-10}$  М не влияет на активность гибридного белка и его комплекса со стрептавидином.

Далее были оптимизированы условия проведения ИФА. Показано, что оптимальное соотношение ком-

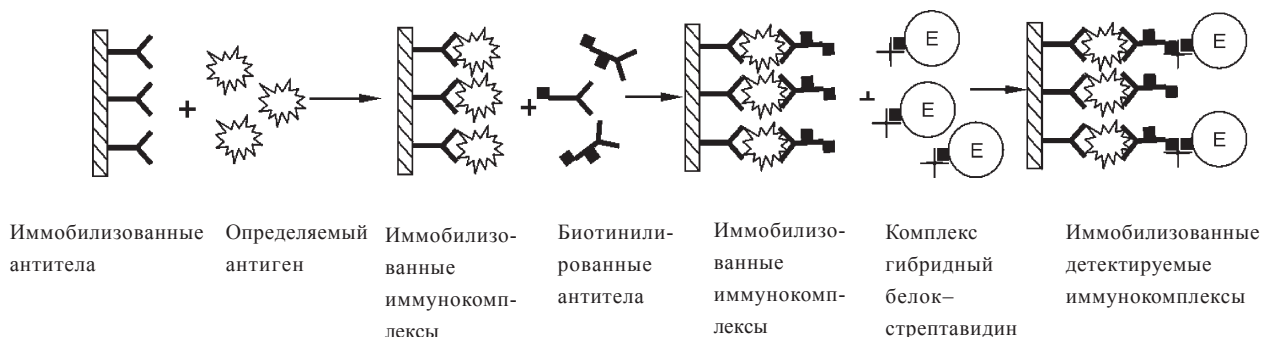


Рис. 2. Схема образования детектируемого комплекса

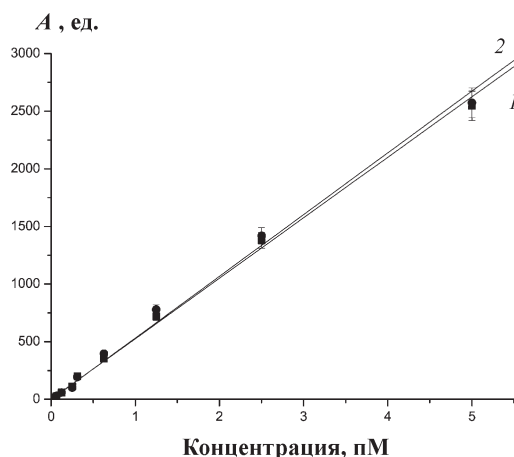


Рис. 3. Зависимость интенсивности билюминесценции от концентрации гибридного белка (1) и комплекса гибридного белка со стрептавидином (2). Условия измерения описаны в экспериментальной части

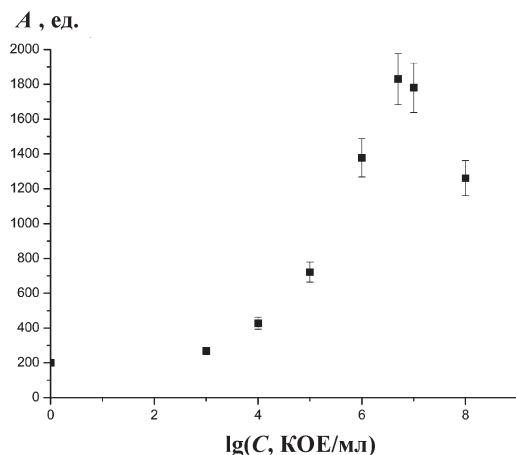


Рис. 4. Зависимость интенсивности билюминесценции от логарифма концентрации клеток *Salmonella typhimurium*, сорбированных на планшет, активированный моноклональными небиотинилированными антителами

понентов при образовании комплекса гибридного белка со стрептавидином составляет 1:1. При увеличении относительной концентрации стрептавида возрастает конкуренция последнего с комплексом стрептавидин–люцифераза за биотин, находящийся на поверхности антител, что может привести к уменьшению билюминесцентного сигнала за счет образования недетектируемого комплекса антитело–биотин–стрептавидин. Установлено, что оптимальная концентрация комплекса для проведения ИФА составляет 10 нМ. Было показано, что минимальная неспецифическая сорбция наблюдается при использовании буфера PBST для инкубации антител с использованием 1%-го раствора БСА в качестве блокирующего агента. Для оптимизации длительности проведения реакции между гибридным белком и стрептавидином была изучена кинетика комплексообразования. При различных соотношениях гибридного белка и стрептавида варьировали длительность инкубации. При соотношении 1:1 интенсивность билюминесценции выходит на плато через 60 мин, в то время как при двукратном избытке стрептавида наблюдается небольшой рост интенсивности и после 2 ч инкубации. Для комплекса состава 1:1 оптимальное время инкубации составляет 90 мин, кроме того, для него наблюдалась и наилучшая воспроизводимость. Комплекс состава 1:1 и был использован в последующих экспериментах. В предварительно оптимизированных условиях был проведен гетерогенный сэндвич-анализ для определения клеток сальмонелл *Salmonella typhimurium*. Иммуобилизацию препарата инактивированных клеток проводили на активированный моноклональными небиотинилированными антителами полистирольный планшет, при этом динамический диапазон составляет от  $10^4$  КОЕ/мл до  $5 \cdot 10^6$  КОЕ/мл (рис. 4).

Авторы выражают благодарность Л.Г. Стояновой за содействие в получении биомассы нативных клеток *Salmonella typhimurium*.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 11-04-00698-а).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. DeLuca M. // Adv. Enzymol. 1976. **44**. P. 37.
2. Ugarova N. N. // J. Biolum. Chemilum. 1989. **4**. P. 406.
3. Fraga H. // Photoch. Photobiol. Sci. 2008. **7**. P. 146.
4. Seliger H.H., McElroy W.D. // Arch. Biochem. Biophys. 1960. **88**. P. 136.
5. Ando Y. N. K., Yamada N., Enomoto T., Irie T., Kubota H., Ohmiya Y., Akiyama H. // Nature Photon. 2008. **2**. P. 44.
6. Viviani V. R., Ohmiya Y. // Photoproteins in Bioanalysis / Eds. S. Daunert, S.K. Deo. Weinheim, 2006. P. 49.
7. Greer L. F., Szalay A. A. // Luminescence. 2002. **17**. P. 43.
8. Lundin A. // Methods Enzymol. 2000. **305**. P. 346.
9. Dawn H. M., Lim D. V. // Journal of Food Protection. 2010. **73**. P. 739.
10. White P. J., Squirrell D. J., Arnaud P., Lowe C. R., Murray J. A. // Biochem J. 1996. **319**. P. 343.
11. Law G. H., Gandelman O. A., Tisi L. C., Lowe C. R., Murray J. A. // Biochem J. 2006. **397**. P. 307.
12. Eiry K., Tamotsu I., Yoshihito I., Masuo A. // Anal. Biochem. 1993. **208**. P. 300.
13. Karp M., Oker-Blom C. // Biomol. Eng. 1999. **16**. P. 101.
14. Wang C.-Y., Sam Hitz, Andrade J. D., Stewart R. J. // Anal. Biochem. 1997. **246**. P. 133.

15. Ohkuma H., Abeb K., Kosaka Y., Maeda M. // Anal. Chim. Acta. 1999. **395**. P. 265.
16. Tatsumi H., Fukuda S., Kikuchi M., Koyama Y. // Anal. Biochem. 1996. **243**. P. 176.
17. Chapman-Smith A., Cronan J. E. // J. Nutr. 1999. **129**. P. 477.
18. Кокушаров М. И., Угарова Н. Н. // Вестн. Моск. ун-та. 2009. **50**. С. 23.
19. Merkulova T. I., Abbasova S. G., Moshnikova A. B. // Hybridoma. 1995. **14**. P. 557.
20. Кокушаров М. И., Угарова Н. Н. // Биохимия. 2008. **73**. С. 1071.
21. Cronan J. E. // J. Biol. Chem. 2002. **277**. P. 22520

Поступила в редакцию 20.10.10

## FUSION PROTEIN OF LUCIFERASE *Luciola mingrelica*–BIOTIN CARBOXYL CARRIER PROTEIN: PRODUCTION, PROPERTIES, APPLICATION

M.I. Koksharov, D.V. Smirnova, S.G. Abbasova, N.N. Ugarova

(Division of Chemical Enzymology)

A plasmid was constructed by genetic engineering methods that codes a fusion protein (4TS-bccp87) including the thermostable mutant of *Luciola mingrelica* firefly luciferase (4TS) and the carboxyl-terminal 87 residues of *E. coli* biotin carrier protein (bccp87). It was shown that about 60% of the fusion protein was biotinylated after the expression in *E. coli* BL21(DE3). Catalytic properties, thermostability and bioluminescence spectra of the fusion protein were shown to be similar to that of the initial luciferase. It was demonstrated that streptavidin-biotinylated luciferase complex can be used in ELISA for the assay of *Salmonella typhimurium* cells in the interval from  $10^4$  to  $5 \cdot 10^6$  CFU/ml.

**Key words:** firefly luciferase, *Luciola mingrelica*, fusion protein, bccp, *Salmonella typhimurium*, streptavidin, biotin.

**Сведения об авторах:** Кокушаров Михаил Иванович – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук, (koksharov83@ya.ru); Смирнова Дарья Васильевна – аспирант химического факультета МГУ (S\_mir\_nova@mail.ru); Аббасова Светлана Георгиевна – ст. науч. сотр. Института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А.Овчинникова, докт. биол. наук; Угарова Наталья Николаевна – глав. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук, профессор (nugarova@gmail.com).