



УДК 577.112.088.3

МУТАНТНЫЕ OmpF-ПОРИНЫ *Yersinia pseudotuberculosis* С ДЕЛЕЦИЯМИ НАРУЖНЫХ ПЕТЕЛЬ: СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ, ЭКСПРЕССИЯ, ВЫДЕЛЕНИЕ, РЕФОЛДИНГ

© 2012 г. О. В. Сидорова[#], М. П. Исаева, В. А. Хоменко, О. Ю. Портнягина,
Г. Н. Лихацкая, Н. Ю. Ким, О. Д. Новикова, Д. К. Чистюлин, Т. Ф. Соловьева

Учреждение ДВО РАН Тихоокеанский институт биоорганической химии,
690022 Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159

Поступила в редакцию 20.06.2011 г. Принята к печати 01.07.2011 г.

С помощью сайт-направленного мутагенеза рекомбинантной плазмиды, несущей ген *ompF* *Yersinia pseudotuberculosis*, получены гены мутантных OmpF-поринов с делециями наружных петель L1, L6 и L8. Мутантные белки синтезировали в клетках штамма Rosetta *Escherichia coli* (Novagen, США) и выделяли из телец включения. В результате рефолдинга, проведенного при помощи диализа и ионообменной хроматографии, получили олигомерные формы мутантных белков. Показано, что мутантные белки отличаются от полноструктурного рекомбинантного порина как вторичной, так и третичной структурой. С помощью техники бислойных липидных мембран установлено, что отсутствие петель L1, L6 и L8 не влияет на уровень наиболее вероятной проводимости каналов OmpF-порина псевдотуберкулезного микроба. Согласно данным иммуноблоттинга и ИФА, отсутствие петель L1, L6 и L8 заметно влияет на антигенную структуру мутантных поринов.

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, OmpF порин, рекомбинантные белки, делеции наружных петель.

ВВЕДЕНИЕ

Порообразующие белки (порины) наружной мембраны (НМ) грамотрицательных бактерий принадлежат к классу β -структурированных интегральных мембранных белков, образующих гидрофильные поры для пассивной диффузии низкомолекулярных веществ. В нативной мембране они существуют в виде гомотримеров, мономерная единица которых представляет собой образованный антипараллельными β -тяжами цилиндр, окружающий водонаполненный канал. Соединяющие β -тяжи участки полипептидной цепи белка, так называемые петли, достаточно коротки, если расположены со стороны периплазмы; значительно более длинные петли, находящиеся с внешней стороны мембраны, формируют в пространстве более сложные структуры. Показано, что участки, соответствующие наружным петлям поринов, совпадают с гидрофильными максимумами аминокислотной последовательности белка и формируют антигенные детерминанты [1]. Кроме того, по мнению ряда

и следователей, изменение конформации петель L3, L5, L7 и L8 в значительной степени влияет на эффективность диффузии через пору [2], а петля L2 играет важную роль в стабилизации пространственной структуры тримера порина в НМ [1]. Тем не менее, экспериментальные данные о взаимосвязи между тонкой структурой белка и его биологическими свойствами к настоящему времени накопились лишь для ограниченного числа порообразующих белков [3]. В связи с этим, определение структурно-функциональной роли некоторых наружных петель OmpF-порина *Y. pseudotuberculosis* может существенно дополнить представление об участии этого белка во взаимоотношениях бактерий псевдотуберкулеза с макроорганизмом.

Целью данного исследования явилась разработка методов получения мутантных форм OmpF порина из НМ *Y. pseudotuberculosis* с делециями некоторых наружных петель, а также характеристика пространственной, антигенной структуры и порообразующей активности полученных рекомбинантных белков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сайт-направленный мутагенез гена OmpF-порина. Для получения мутантных белков с делециями петель L1, L6 и L8 был проведен сайт-направленный мутагенез рекомбинантной плазми-

Сокращения: PMSF – фенилметилсульфонилфторид, DOC – дезоксихолат натрия, IPTG – изопропил- β -D-тио-галактопиранозид, Zw.3-14 – Zwittergent 3-14 (N-тетрадецил-N,N-диметил-3-аммоний-1-пропансульфонат), БЛМ – бислойная липидная мембрана НМ – наружная мембрана, РБ – рекомбинантный белок, ТВ – тельца включения.

[#] Автор для переписки: тел.: +7 (4232) 31-07-19; факс: +7 (4232) 31-40-50; эл. почта: olga_ximik@mail.ru.

Таблица 1. Характеристика праймеров, использованных в работе

Название	Последовательность (5'-3')	Назначение
T7 prom	TAATACGACTCACTATAGGG	Секвенирующие праймеры
T7 term	GCTAGTTAATGCTCAGCGG	
Del_L1_for	GTCACCTCTTTCTCCGATGGCGACAAGTC	Делеция петли L1
Del_L1_rev	GACTTGTGCGCCATCGGAGAAAGAGTGAC	
Del_L6_for	CTCAGAACCTGACTGCGAACAAGACTCG	Делеция петли L6
Del_L6_rev	CGAGTCTTGTTTCGCAGTCAGGTTCTGAG	
Del_L8_rev	CAACCTGTTGGACGTTGTTGCTGTTGGC	Делеция петли L8
Del_L8_rev	GCCAACAGCAACAACGTCCAACAGGTTG	

ды рЕТ41a(+)-m55, несущей *ompF*-ген. Эта плаزمид была сконструирована нами ранее для экспрессии зрелой формы OmpF-порины [4]. С целью получения метилированной ДНК исходная плазмид была проведена через клетки штамма *E. coli* XL-1 Blue. Для удаления наружных петель L1, L6 и L8 были разработаны мутагенные олигонуклеотидные праймеры (табл. 1), в которых отсутствовали соответствующие участки. Сайт-направленный мутагенез проводили, используя полимеразу Pfu Ultra II (Stratagene, США), в соответствии с алгоритмом, предложенным в работе [5]. Полученную после амплификации смесь мутантных и исходных плазмид обработали эндонуклеазой рестрикции *DpnI* (Fermentas, Литва) для расщепления метилированных и полуметилированных плазмидных ДНК. Затем этой смесью трансформировали клетки штамма *E. coli* Rosetta. С целью отбора колоний, содержащих “функциональные” мутантные плазмиды,

была проведена аналитическая экспрессия белков в 30 мл среды. Результаты экспрессии оценивали с помощью SDS-ПААГ-электрофореза (рис. 1, в качестве контроля был использован полноструктурный мономер рекомбинатного OmpF-порины). Как видно из рисунка, белок экспрессировался в двух формах, одна из которых имеет подвижность несколько большую, нежели у контрольного белка. Мы предположили, что именно эта полипептидная зона соответствует порину с целевыми мутациями.

Колонии 1 и 2 (рис. 1а), а также колонии 2 и 4–8 (рис. 1б), экспрессирующие мутантные белки, были отобраны для амплификации и секвенирования *ompF*-гена. По результатам секвенирования были отобраны плазмиды, в которых присутствовали делеции соответствующих петель и сохранялась целостность остальной части белкокодирующей последовательности *ompF*. Таким образом,

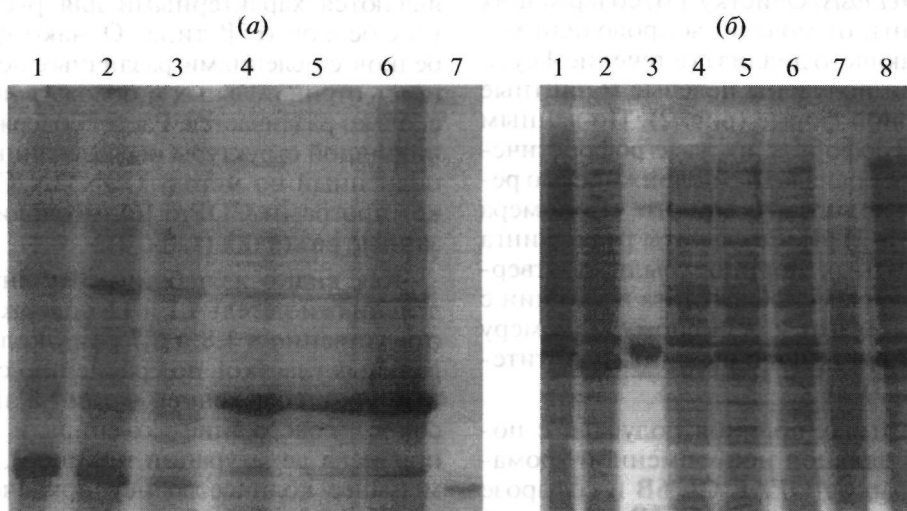


Рис. 1. SDS-ПААГ-электрофоретический анализ экспрессии мутантных OmpF-поринов с делециями петель: L1 (а, 1–6), L8 (б, 1, 2) и L6 (б, 4–8). Дорожки 7 (а) и 3 (б) — мономер полноструктурного OmpF порина *Y. pseudotuberculosis* (контроль).

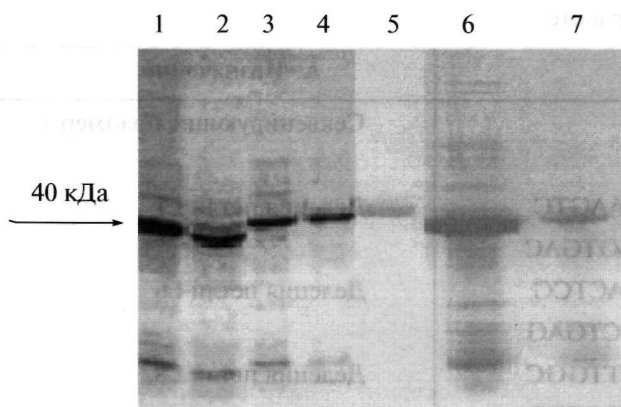


Рис. 2. Электрофореграмма мутантных белков: **del1** (1, 2) и **del6** (3, 4) непрогретых (1, 3) и прогретых при 100°C (2, 4); 5 – рекомбинантный мономер OmpF-порина *Y. pseudotuberculosis* **РБ-1** (контроль, экспрессия в штамме BL21 (DE3) *E. coli*); 6, 7 – **del8** (непрогретый и прогретый при 100°C соответственно).

установлено, что отобранные “функциональные” колонии продуцируют целевые мутантные белки.

Выделение и рефолдинг мутантных форм рекомбинантного OmpF порина *Y. pseudotuberculosis*. Выделение белков с делециями петель **L1**, **L6** и **L8** (далее – образцы **del1**, **del6** и **del8**) проводили согласно процедуре, разработанной для получения полноструктурного рекомбинантного OmpF порина [4] за исключением того, что в случае мутантных белков использовали удвоенное количество лизоцима и ДНКазы. В качестве контроля параллельно с мутантными белками выделяли и полноструктурный рекомбинантный OmpF-порин *Y. pseudotuberculosis*. Очистку ТВ, содержащих мутантные порины, от мочевины проводили методом исчерпывающего диализа (в течение 4 сут). В результате были получены целевые мутантные белки в мономерной форме (рис. 2). По данным SDS-ПААГ-электрофореза, их электрофоретические подвижности совпадали с подвижностью рекомбинантного полноструктурного мономера OmpF-порина (**РБ-1**) [4]. Результаты рефолдинга мономеров мутантных поринов были подтверждены с помощью иммуноблоттинга в реакции с кроличьими антителами к нативному мономеру OmpF-порина (**OmpF**) [6] и с мышинными антителами к **РБ-1** (рис. 3).

Тримеры мутантных поринов получали с помощью последовательной ионообменной хроматографии: на сефарозе DEAE CL 6В и сефарозе CM CL 4В, как описано в работе [4]. Фракции, полученные после двух циклов хроматографии, содержали олигомерную форму (тримеры) рекомбинантного порина. Результаты сборки пори-

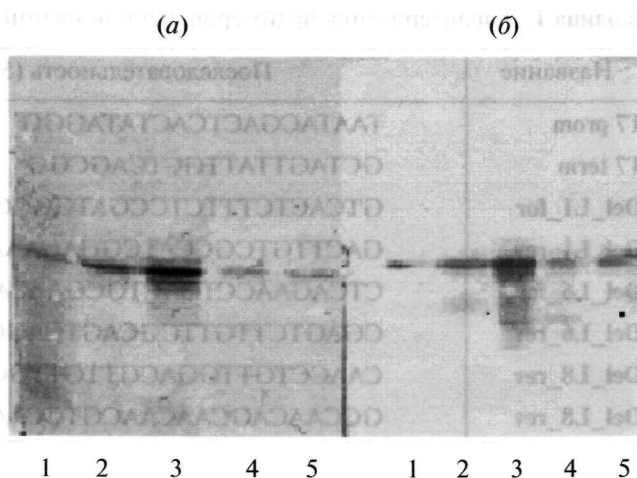


Рис. 3. Иммуноблоттинг белковых фракций: **del1** (1а, б), **del6** (2а, б), **del8** (4а, б), нативного мономера **OmpF**-порина (3а, 5б) и полноструктурного рекомбинантного мономера OmpF-порина **РБ-1** (5а, 3б) с антителами кролика, полученными при их иммунизации **OmpF** (а), и с антителами мыши, полученными при иммунизации **РБ-1** (б).

на были подтверждены данными SDS-ПААГ-электрофореза (рис. 4).

Пространственная структура мутантных поринов. Круговой дихроизм. Для спектров КД мутантных поринов в ароматической области спектра (рис. 5б) по сравнению со спектром полноструктурного рекомбинантного тримера (**РБ-2**) наблюдается более низкая амплитуда (**del6** и **del8**) и меньшая степень разрешенности (**del1**, **del6** и **del8**) полос, что указывает на более рыхлую третичную структуру тримеров мутантных белков.

Спектры КД образцов мутантных поринов в области поглощения пептидных связей (рис. 5а) являются характерными для β -структурированных белков $\alpha+\beta$ -типа. Однако форма спектров белков с делециями различных петель (интенсивность отрицательных и положительных полос) несколько различается. Расчет содержания элементов вторичной структуры исследованных поринов, выполненный по методу CONTIN/CONTINLL (пакет программ CDPPro [6], позволил выявить указанные различия (табл. 2).

Как видно из таблицы, мутантные порины с делециями петель **L1** и **L6** содержат большее (соответственно в 1.8 и 2.7 раза) количество α -спиральных участков по сравнению с **РБ-2**. Мутантный порин с делецией петли **L6**, несмотря на высокое содержание α -спирали (характерного признака денатурации поринов), содержит наименьшее количество неупорядоченной структуры. Именно этот образец порина имеет сходное с **РБ-2** соотношение двух типов β -структуры (β денат./ β неденат.): 0.5 и 0.55 соответственно. Для других мутантных белков (**del1** и **del8**) эти соотно-

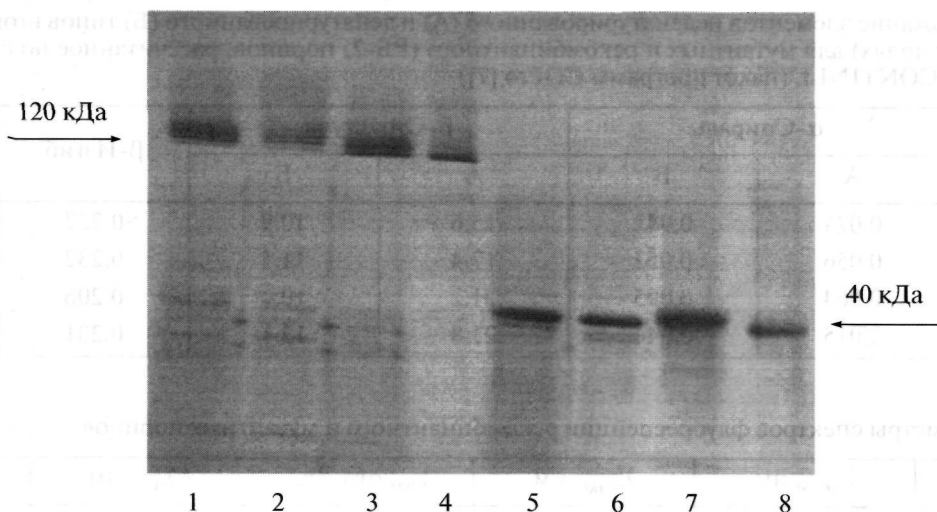


Рис. 4. Электрофореграмма мутантных белков **del1** (1, 5), **del6** (2, 6) и **del8** (3, 7) в тримерной (1, 2, 3) и мономерной (до ионообменной хроматографии) форме (5, 6, 7); 4, 8 – полноструктурный рекомбинантный OmpF-порин РБ-2 в тримерной и мономерной форме соответственно (контроли).

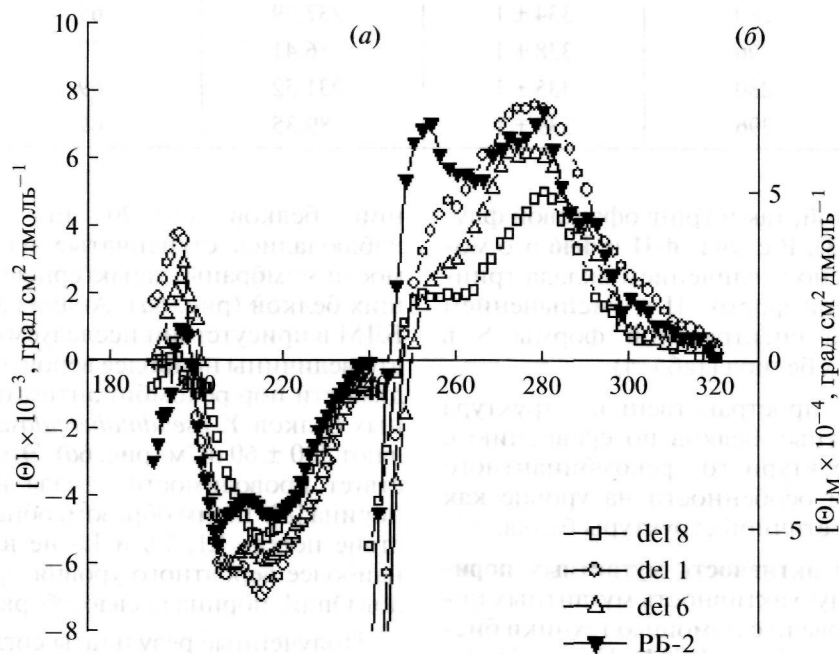


Рис. 5. Спектры КД рекомбинантного и мутантных тримеров порина *Y. pseudotuberculosis* в пептидной (а) и ароматической (б) области.

шения имеют большую величину и равны, соответственно, 0.66 и 0.70. Таким образом, отсутствие той или иной наружной петли влияет на соотношение элементов регулярной вторичной структуры порина.

Собственная белковая флуоресценция. Спектры суммарной эмиссии тримеров исследованных поринов и их аппроксимация спектральными формами излучения остатков триптофана и тирозина (табл. 3 и 4) указывают на значительные различия

в микроокружении ароматических флуорофоров. Отсутствие петли **L8** в наименьшей степени приводит к изменениям в третичной структуре рекомбинантного тримера. В то же время в случае мутантных поринов с делециями петель **L1** и **L6** по сравнению с **РБ-2** наблюдается существенное увеличение доли триптофановых остатков спектральной формы I (в 1.8 и 2.2 раза соответственно). Тем не менее, все мутантные белки, подобно **РБ-2**, имеют длинноволновое положение макси-

Таблица 2. Содержание элементов неденатурированного (А) и денатурированного (Б) типов вторичной структуры (в единичных долях) для мутантных и рекомбинантного (РБ-2) поринов, рассчитанное по спектрам КД методом CONTIN/CONTINLL (пакет программ CDPPro [7])

Образец	α -Спираль		β -Структура		β -Изгиб	Неупоряд структура
	А	Б	А	Б		
del8	0.024	0.042	15.6	10.9	0.227	0.441
del1	0.056	0.052	17.4	11.5	0.232	0.371
del6	0.064	0.095	21.2	10.4	0.206	0.319
РБ-2	0.015	0.044	21.8	12.1	0.231	0.370

Таблица 3. Параметры спектров флуоресценции рекомбинантного и мутантных поринов

Образец	$\lambda_{\text{возб}}$, нм	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$I_{\text{фл}}$, отн. ед.	$\Delta\lambda_{1/2}$, нм	R (I_{320}/I_{350})
del8	280	329 ± 1	187.17	63	1.293
	296	337 ± 1	67.83	61	1.048
del1	280	333 ± 1	265.43	65	1.239
	296	338 ± 1	99.78	57	1.055
del6	280	334 ± 1	237.39	65	1.231
	296	338 ± 1	86.41	57	1.055
РБ-2	280	335 ± 1	231.52	69	1.170
	296	339 ± 1	89.35	61	0.996

мумов как суммарной, так и триптофановой флуоресценции (табл. 3). В случае **del1** и **del6** это может быть обусловлено увеличением вклада триптофана спектральной формы II и уменьшением вклада триптофана спектральной формы S в эмиссию мутантных белков (табл. 4).

Таким образом, пространственная структура полученных мутантных белков по сравнению с таковой полноструктурного рекомбинантного порина имеет свои особенности на уровне как вторичной, так и третичной структуры белка.

Функциональная активность мутантных поринов. Функциональную активность мутантных поринов охарактеризовали с помощью техники бислойных липидных мембран (БЛМ). При добавле-

Таблица 4. Расчет содержания (в единичных долях) остатков триптофана из спектра флуоресценции рекомбинантного и мутантных поринов (при возбуждении 296 нм)

Образец	S*	I	II	III
del8	0.102	0.258	0.285	0.355
del1	0.000	0.361	0.443	0.196
del6	0.004	0.445	0.358	0.187
РБ-2	0.099	0.201	0.269	0.431

* $\lambda_{\text{макс}}$ S-формы = 315–317 нм; $\lambda_{\text{макс}}$ формы I = 330–332 нм; $\lambda_{\text{макс}}$ формы II = 340–343 нм, $\lambda_{\text{макс}}$ формы III = 350–353 нм.

нии белков (10–20 нг) в водную фазу наблюдались ступенчатые изменения проводимости мембраны, характерные для порообразующих белков (рис. 6а). Анализ записей тока через БЛМ в присутствии исследуемых белков показал, что величины наиболее вероятного уровня проводимости пор рекомбинантного порина и мутантных белков *Y. pseudotuberculosis* близки и составляют 300 ± 60 пСм (рис. 6б). Это значение соответствует проводимости канала нативного тримера порина [8]. Таким образом, обнаружено, что отсутствие петель L1, L6 и L8 не влияет на величину наиболее вероятного уровня проводимости каналов OmpF порина псевдотуберкулезного микроба.

Полученные результаты согласуются с литературными данными. Ранее для мутантов OmpF порина *E. coli* с делециями внешних петель, было показано, что отсутствие одной из петель не влияет на эффективность встраивания мутантных белков в БЛМ [9]. Кроме того, мутации не оказывают существенного влияния на потенцилозависимость OmpF, а значения критического напряжения для всех мутантов не обнаруживают существенного различия с поринами дикого типа.

Иммунохимическая характеристика мутантных поринов. Антигенная структура мутантных белков была охарактеризована с помощью ИФА.

Обнаружено, что мутантные порины с делециями наружных петель взаимодействуют со специфическими антителами к мономерам полно-

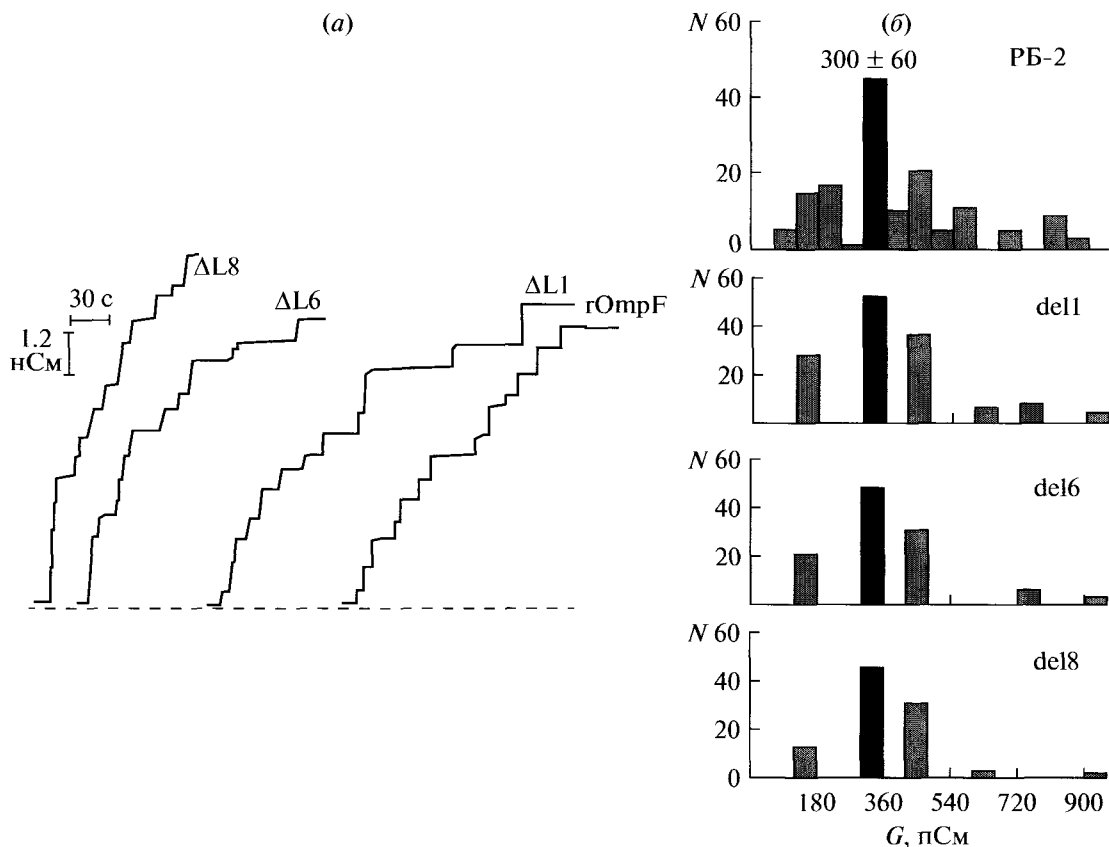


Рис. 6. Запись тока через БЛМ (а) и гистограммы уровней проводимости БЛМ (б) в присутствии полноструктурного рекомбинантного OmpF-порина (РБ-2) и его мутантных форм. По оси ординат: N – число каналов; по оси абсцисс: G – проводимость каналов в пСм.

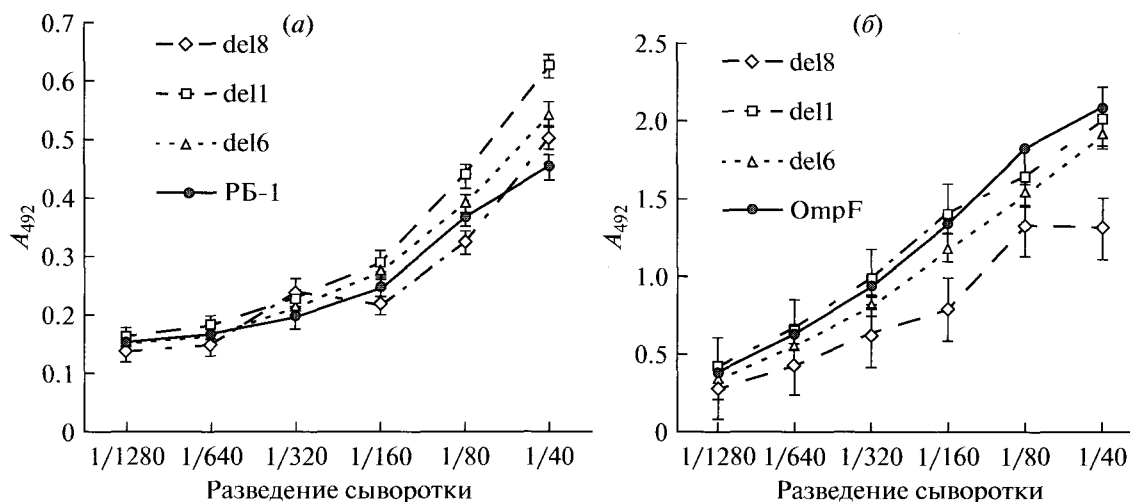


Рис. 7. Взаимодействие мутантных поринов со специфическими антителами к полноструктурному рекомбинантному РБ-1 (а) и к нативному порину OmpF в мономерной форме (б).

структурного рекомбинантного и нативного OmpF поринов (рис. 7). Результаты реакции связывания мутантных белков и мономера полноструктурного рекомбинантного порина (РБ-1) с антисы-

вороткой к последнему аналогичны (рис. 7а). Это свидетельствует о том, что участки последовательности порина, соответствующие наружным петлям L8, L1, L6, не участвуют в формировании

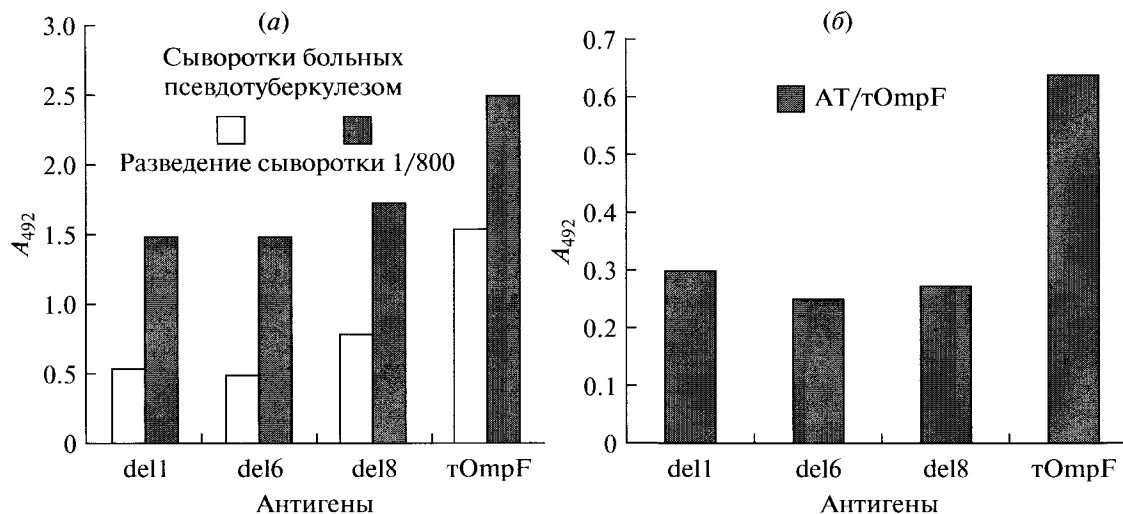


Рис. 8. Взаимодействие нативного (tOmpF) и мутантных тримеров порина с сыворотками крови больных псевдотуберкулезом (а) и с иммунными сыворотками кроликов (б).

антигенных детерминант **РБ-1**. Подобная картина наблюдается и при взаимодействии мутантных поринов **del1** и **del6** с антителами к нативному мономеру OmpF порина (**OmpF**) (рис. 7б). Напротив, белок **del8** взаимодействует с этими антителами на 30–40% менее эффективно.

Можно предположить, что структура антигенных детерминант рекомбинантного и нативного мономеров порина имеет лишь частичное соответствие за счет недостаточно сформированных (в случае рекомбинантного белка) конформационных детерминант, образующихся в результате сближения отдельных участков молекулы в процессе сборки третичной структуры белка. Полученный результат может свидетельствовать о том, что участки последовательности белка, соответствующие петле **L8**, входят в состав конформационных антигенных детерминант нативного мономера порина.

Для выяснения того, насколько антигенная структура полученных мутантных белков отличается от таковой для нативного тримера порина (tOmpF), мы использовали белки **del1**, **del6** и **del8** в качестве антигенов в реакции связывания со специфическими антителами кроликов, иммунизированных tOmpF, и для обнаружения антител к порину в сыворотках больных. Известно, что неспецифические порины НМ грамотрицательных бактерий относятся к высоко иммуногенным белкам, причем высокий уровень антител к ним наблюдается как при искусственной иммунизации, так и при естественном развитии инфекции [10]. Ранее было показано, что OmpF порин НМ *Y. pseudotuberculosis* является высоко эффективным диагностическим антигеном в разработанной нами ИФА тест-системе для выявления псев-

дотуберкулеза [11]. Обнаружено, что полученные мутантные порины взаимодействуют с иммунными сыворотками экспериментальных животных и сыворотками крови больных псевдотуберкулезом в диагностическом разведении (1 : 800), хотя и проявляют активность существенно меньшую по сравнению с активностью нативного тримера (tOmpF) порина (рис. 8а и б).

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы. Отсутствие в структуре белка наружных петель **L1**, **L6**, **L8** определенным образом изменяет антигенную структуру OmpF порина НМ *Y. pseudotuberculosis*. В наибольшей степени эти изменения затрагивают конформационные детерминанты порина, формирующиеся уровне третичной и четвертичной структуры белка, поскольку заметное снижение иммунохимической активности мутантных поринов было отмечено при взаимодействии с иммунными сыворотками к нативным тримерам порина. Кроме того, очевидно, в процессе “презентации” поринов НМ иерсиний клеткам иммунной системы человека и животных имеет значение не только структура вводимого антигена, но и видо-вая принадлежность организма-хозяина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Плазмиды. В качестве матрицы для сайт-направленного мутагенеза OmpF порина использовалась плазида pET-41(+)-m55, сконструированная на основе плазмидного вектора pET-41(+)-а и содержащая ген *ompF Y. pseudotuberculosis*.

Ферменты. ДНК-полимераза Pfu Ultra II (Stratagene, США); GoTaq-ДНК-полимераза (Promega, США); рестриктазы *NdeI*, *BamHI* и *DpnI* (Fermentas, Литва).

Праймеры. Праймеры синтезированы НПО “Евроген”, Россия. Характеристики праймеров указаны в табл. 1.

Сайт-направленный мутагенез. ПЦР с мутагенными праймерами проводили в 25 мкл реакционной смеси, в качестве матрицы использовали плазмиду рЕТ-41a(+)-m55. Состав смеси для ПЦР объемом 50 мкл содержал: 50 нг плазмидной ДНК; 50 нМ dNTP; 2.5 ед. полимеразы Pfu Ultra II; буфер 1× Pfu Ultra II. Смесь для ПЦР была разделена на 2 равные части: одна для добавления прямого праймера (40 пМ), другая – обратного (40 пМ). Температурный режим ПЦР включал: предварительную денатурацию плазмидной ДНК при 95°C – 2 мин (1), денатурацию ДНК при 94°C – 20 с, отжиг праймеров при 55°C – 20 с, и достройку ДНК при 72°C – 2 мин (2). Эти стадии повторяли 10 раз, после чего содержимое пробирок объединяли, добавляли полимеразу Pfu Ultra II (в количестве, соответствующем 2.5 ед. активности) и проводили еще 18 циклов реакции при тех же условиях (ПЦР смесь). Синтез ДНК проводили при 72°C в течение 7 мин (3). После окончания реакции пробирки помещали в лед (на 2 мин), затем полученные смеси обрабатывали эндонуклеазой *DpnI*. Рестрикцию проводили в 50 мкл реакционной смеси, включающей: буфер для рестриктазы; 10 ед. эндонуклеазы рестрикции *DpnI*; 25 мкл ПЦР-смеси. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение ночи, затем прогревали при 80°C в течение 20 мин. Обработанная рестриктазой смесь была использована для трансформации штамма Rosetta *E. coli*. Трансформацию компетентных клеток осуществляли методом электропорации при напряжении 1700 В в течение 5 мс на приборе Multiporator (Eppendorf, Германия). Селекцию рекомбинантных клонов проводили в присутствии канамицина (50 мкг/мл) и хлорамфеникола (34 мкг/мл).

Для идентификации делеций проводили ПЦР “на колониях”, используя полимеразу GoTaq (Promega, США) и T7-праймеры. Состав смеси для ПЦР (50 мкл): 1 мкл клеточного лизата; 50 нМ dNTP; 2.5 ед. полимеразы GoTaq; буфер 1× GoTaq, по 250 пмоль прямого и обратного праймеров. Температурный режим ПЦР включал: предварительную денатурацию ДНК при 95°C – 2 мин (1); денатурацию ДНК при 94°C – 20 с, отжиг праймеров при 55°C – 20 с, достройку ДНК при 72°C – 1 мин (2) (п. 2 повторяли 30 раз); синтез ДНК при 72°C – 7 мин (3). Результаты реакции анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. ПЦР-фрагменты очищали с помощью коммерческого набора DNA Extraction Kit (Fermentas, Литва) и секвенировали с помощью праймеров T7prom/T7term (табл. 1) на автоматическом ДНК-анализаторе 3130XL (Applied Biosystems, США).

Экспрессия и выделение мутантных *OmpF*-поринов. Клеточную биомассу наращивали при 37°C при интенсивном перемешивании (180 об/мин) в 20 мл среды 2× YT в присутствии канамицина (50 мкг/мл) и хлорамфеникола (34 мкг/мл) в течение 14–16 ч (ночь). Затем 3 мл ночной культуры переносили в 150 мл 2× YT, содержащей канамицин и хлорамфеникол, и снова инкубировали при тех же условиях. Наращивание продолжали до тех пор, пока оптическое поглощение среды с клетками (A_{600}) не достигала значения 0.4–0.6. После этого к суспензии добавляли 150 мкл 1М IPTG до конечной концентрации 1 мМ. Суспензию клеток инкубировали в выше указанных условиях в течение 1 ч. Затем клетки центрифугировали при 8 тыс. об/мин в течение 8 мин и отмывали дважды от питательной среды и IPTG фосфатно-солевым буфером (PBS). Полученные клетки хранили при температуре –20°C.

Для выделения ТВ клетки *E. coli*, полученные после экспрессии, осаждали центрифугированием при 5000×g в течение 5 мин, осадок (5 г) ресуспендировали в 15 мл 50 мМ Трис-НСl-буфера, содержащего 1 мМ EDTA, 100 мМ NaCl, pH 8.0 (TEN-буфер). К суспензии осадка добавляли PMSF (40 мкл из 100 мМ сток-раствора изопропанола) и 4 мг лизоцима. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин, добавляли 25 мг DOC и выдерживали ее в течение 20 мин на водяной бане при 37°C. Добавляли 30 мкл ДНКазы (сток-раствор 1 мг/мл), смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока раствор переставал быть вязким. Смесь центрифугировали при 12000 g в течение 20 мин при 4°C. Осадок ТВ отмывали TEN-буфером дважды, растворяли в холодном TEN-буфере, добавляли мочевины и PMSF до конечных концентраций 8 М и 0.1 мМ соответственно. Смесь озвучивали на льду при 44 мГц в течение 10 мин (в 2 этапа с интервалом 1 мин). Нерастворившийся осадок отделяли центрифугированием при 12000 g в течение 10 мин при 4°C. Осадок ТВ отмывали TEN-буфером дважды, разбавляли 16 мл 25 мМ Трис-НСl-буфера (pH 8.5), содержащего 150 мМ NaCl и 0.1% Zw. 3-14 (буфер А), выдерживали в течение ночи при комнатной температуре при перемешивании, затем центрифугировали при 10000 g, 15 мин при 4°C. Супернатант (6 мл) диализовали против 25 мМ Трис-НСl-буфера (pH 8.5), содержащего 0.1% Zw. 3-14, в течение 4 сут при 4°C и наносили на колонку (1.5 × 40 см) с DEAE-сефарозой CL 6B. Элюирование проводили, используя линейный градиент концентрации NaCl (1 М, 70 мл) в буфере А. Наличие белка контролировали с помощью SDS-ПААГ-электрофореза. Фракции, содержащие рекомбинантный белок, объединяли, диализовали против 20 мМ Na-цитратного буфера (pH 3.0), содержащего 0.1 % Zw. 3-14 (буфер Б) и наносили на колонку (1.5 × 40 см) с

СМ-сефарозой CL 4B, элюирование проводили, используя градиент NaCl (0.1 М, 70 мл) в буфере Б. Наличие белка контролировали с помощью SDS-ПААГ-электрофореза. В результате были получены тримеры мутантных поринов.

Спектроскопические методы исследования пространственной структуры поринов. УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Cecil CE 7200 (Англия) в кварцевых кюветах с толщиной слоя 1 см при ширине щели 1 нм. Поправку на светорассеяние раствора белка проводили, как описано в работе [12]. Удельный коэффициент поглощения $A^{0.1\%}/l_{\text{см}}$ порина (1.27) был определен ранее [6].

Спектры КД регистрировали на спектрополяриметре Jasco-500A (Япония) в кварцевых кюветах с толщиной слоя 1 мм для пептидной и 1 см для ароматической областей спектра. В пептидной области спектра эллиптичность считали как эллиптичность среднего остатка, принимая среднюю молекулярную массу аминокислотного остатка равной 110 Да, в единицах град · см²/дмоль по формуле: $[\theta] = \theta_{\text{набл}} \cdot S \cdot 110/10 \cdot c \cdot l$, где S – чувствительность шкалы прибора, c – концентрация белка, мг/мл, l – длина оптического пути, мм. В ароматической области спектра эллиптичность считали как молярную эллиптичность $[\theta]_{\text{M}}$ с молекулярной массой мономера порина, равной 40 кДа и тримера порина, равной 110 кДа. Калибровку спектрополяриметра проводили по 0.06% водному раствору D-камфора-10-сульфоната аммония. Отношение эллиптичностей полос при 191 и 290 нм составляло 2.05.

Спектры флуоресценции поринов измеряли на спектрофлуориметре Hitachi 850 (Япония) в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см. Возбуждение флуоресценции проводили светом с длинами волн 280 и 296 нм. Спектры флуоресценции, скорректированные по родамиду В (Wako Pure Chemical Industries, Япония), регистрировали, вычитая рамановскую полосу буферного раствора. Ширина щели на монохроматорах возбуждения и излучения составляла 5 нм. Разложение экспериментальных спектров на компоненты [13] соответствующие излучению спектральных форм остатков триптофана в белке, проводили, используя программу оптимизации, основанную на методе Маркуардта [14].

Изучение порообразующей активности белков с помощью техники БЛМ. БЛМ формировали по методу Мюллера из раствора 1-моноолеилглицерина в *n*-гептане, как описано в работе [15]. Описание установки и методика измерения электрических параметров в БЛМ приведены в работе [8]. Образцы порина (в заданных концентрациях) добавляли в водную фазу до формирования БЛМ. Все эксперименты проводили при одинаковых стандартных условиях: 0.1 М NaCl, 10 мМ Трис-

HCl-буфер, pH 8.0 при комнатной температуре 22°C, БЛМ получали из 1%-го раствора моноолеилглицерина в *n*-гептане.

Через 30 мин после формирования БЛМ регистрировали ток через бислой при мембранном потенциале –20 или –50 мВ.

SDS-ПААГ-электрофорез проводили в вертикальных пластинах (9 × 12 × 1 мм) 14%-го полиакриламидного геля в присутствии 0.1%-го SDS или в градиенте плотности ПААГ по методу Лэммли [16].

Иммунологические методы. Иммуноферментный анализ. Для исследования сывороток крови применяли непрямой вариант ИФА [17], используя микропланшеты Costar (USA). В качестве антигенных антител использовали коммерческие иммуноферментные конъюгаты производства НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (г. Москва). Результаты учитывали на спектрофотометре μ Quant, BIO-TEK INSTRUMENTS, INC (USA) при 492 нм, в качестве хромогена применяли 0.04% раствор орто-фенилендиамина.

Иммуноблоттинг. Для проведения иммуноблоттинга белки после электрофоретического разделения переносили с неокрашенного геля на нитроцеллюлозную мембрану с помощью прибора для полусухого переноса при силе тока 0.8 мА/см², в течение ночи при 4°C. Мембрану после переноса обрабатывали 5 мМ Трис-HCl-буфером (pH 10.3), содержащим 150 мМ NaCl, 2% Tween-20 (буфер В) для блокирования неспецифического связывания в течение ночи при комнатной температуре. После удаления буфера мембрану инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре с поликлональной кроличьей антисывороткой, разведенной в соотношении 1 : 200 буфером В, сыворотку удаляли и промывали мембрану дважды буфером, содержащим 0.05% Tween 20. Мембрану инкубировали с антителами против IgG кролика, меченными пероксидазой, разведенными в соотношении 1 : 1000 буфером для блокирования неспецифического связывания, в течение 2 ч при комнатной температуре. Мембрану промывали дважды буфером с 0.05% Tween 20 и окрашивали 10 мл 5 мМ Трис-HCl-буфера (pH 7.6), содержащего 150 мМ NaCl, 0.6 мл 0.3% раствора 4-хлор-1-нафтаола в этиловом спирте и 4 мкл H₂O₂, в течение 20 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали, забавляя раствор избытком H₂O.

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных результатов проводили в операционных средах Windows XP с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel. Достоверность результатов подтверждали, определяя стандартное отклонение (σ) и стандартную ошибку (по формуле для ограниченной выборки). Достоверность различий средних величин оценива-

ли с использованием критерия Стьюдента ($p < 0.05$).

Работа поддержана грантами РФФИ № 08-08-00823-а “Конструирование и исследование неспецифических порообразующих белков грамотрицательных бактерий с измененными структурно-функциональными свойствами” и ДВО РАН “Конструирование и структурно-функциональное исследование мутантных OmpF поринов наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis*” по разделу “Фундаментальные исследования молодых ученых”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Achouak W., Heulin T. Pages J.M.* // FEMS Microbiol. Lett. 2001. V. 199. Is. 1. P. 1–7.
2. *Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J.* // J. Mol. Biol. 1990. V. 215. P. 403–410.
3. *Nikaido H.* // Microbiol. & Mol. Biol. Rev. 2003. V. 67. P. 593–656.
4. *Хоменко В.А., Портнягина О.Ю., Новикова О.Д., Исаева М.П., Ким Н.Ю., Лихацкая Г.Н., Вострикова О.П., Соловьева Т.Ф.* // Биооргани. химия. 2008. Т. 34. № 2. С. 1–8 (*Khomenko V.A., Portnyagina O.Yu., Novikova O.D., Isaeva M.P., Kim N.Yu., Likhatskaya G.N., Vostrikova O.P., Solov'eva T.F.* // Rus. J. Bioorgan. Chem. 2008. V. 34. № 2. P. 162–168.)
5. *Wang W., Malcolm B.* // BioTechniques. 1999. № 26. P. 680–682.
6. *Новикова О.Д., Фролова Г.М., Вакорина Т.И., Таранкова З.А., Глазунов В.П., Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С.* // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. № 6. С. 763–772.
7. *Sreerama N., Woody R.W.* // Anal. Biochem. 2000. V. 287. № 2. P. 252–260.
8. *Лихацкая Г.Н., Новикова О.Д., Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С.* // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. № 12. С. 1219–1224.
9. *Basle A., Qutub R., Mehrazin M., Wibbenmeyer J., Delcour A.* // Prot. Engineering, Design and Selection. 2004. V. 17. № 9. P. 665–672
10. *Портнягина О.Ю., Новикова О.Д., Вострикова О.П., Соловьева Т.Ф.* // Бюлл. эксп. биол. мед. 1999. Т. 128. С. 437–440
11. *Гордеев А.В., Портнягина О.Ю., Вострикова О.П., Малашенкова В.Г., Бениова С.Н., Новикова О.Д., Соловьева Т.Ф.* // Патент РФ. № 98122085/14. 2000. № 20. С. 8.
12. *Winder A.F., Gent W.L.G.* // Biopolymers. 1971. V. 10. № 7. P. 1243–1251.
13. *Burstein E.A., Vedenkina N.S., Ivkova M.N.* // Photochem. Photobiol. 1973. № 8. P. 263–279.
14. *Marquardt D.W.* // J. Soc. Indust. Appl. Math. 1963. № 11. P. 431–441.
15. *Mueller P., Rudin D.O., Tien H.T., Wescott W.C.* // Nature. 1962. V. 194. P.979–980.
16. *Laemmli U.K.* // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
17. *Sandt C.H., Wang Y.-D., Wilson R.A., Hill C.W.* // Infect. Immun. V. 65. № 11. P. 4572–4579.

***Yersinia pseudotuberculosis* Mutant OmpF Porins with Deletions of the External Loops: Genetic Constructions Design, Expression, Isolation and Refolding**

O. V. Sidorova[#], M. P. Isaeva, V. A. Khomenko, O. Yu. Portnyagina, G. N. Likhatskaya, N. Yu. Kim, O. D. Novikova, D. K. Chistyulin, and T. F. Solov'eva

[#]Phone: +7 (4232) 310719; fax: +7 (4232) 314050; e-mail: olga_ximik@mail.ru

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Science

Prospect 100 let Vladivostoku, 159, Vladivostok, 690022 Russia

Yersinia pseudotuberculosis outer membrane (OM) recombinant mutant OmpF porins with deletions of the external loops **L1**, **L6** and **L8** were obtained using site-directed mutagenesis of the recombinant plasmid including *ompF* gene. Heterologous expression of the mutant proteins was carried out in strain Rosetta of *Escherichia coli* (Novagen, USA), porins with the deletions were isolated from the inclusion bodies. Mutant proteins in oligomeric form were obtained as result of dialysis and ion-exchange chromatography. Spatial structure of the mutant proteins was demonstrated to have special features in comparison with that of the full-structured OmpF porin on the level of both secondary and tertiary structure. Lacking of the loops **L1**, **L6** and **L8** didn't affect the conductivity level of *Y. pseudotuberculosis* porin channel as shown using bilayer lipid membrane (BLM) technique. Lacking of the loops mentioned above has a significant influence on the antigenic structure of the mutant porins as demonstrated with use of immunoblotting technique and ELISA.

Keywords: Yersinia pseudotuberculosis, OmpF porin, recombinant proteins, deletion of external loops.