

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-112

РЕКОМБИНАНТНЫЙ СТРЕПТАВИДИН ДЛЯ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ**RECOMBINANT STREPTAVIDIN FOR CHEMICAL MODIFICATION**

А. А. Фомина

ООО «НПФ «МИРАЙКОН»», Санкт-Петербург

А. А. Fomina

NPF «MYRAIKON», LLC, Saint Petersburg

✉ Fominaalina13608@mail.ru

Аннотация

Стрептавидин находит широкое применение в задачах биотехнологии благодаря стабильной связи с биотином. Чаще всего для использования этого свойства создаются конъюгаты стрептавидина с другими белками: пероксидазой хрена, антителами и т. д. [1]. Поэтому в ходе работы нами был получен стабильный вариант стрептавидина в *Escherichia coli* с линкером для удобной химической модификации и конъюгации.

Abstract

Streptavidin is widely used in biotechnology due to its stable binding with biotin. Most often, streptavidin conjugates with other proteins: horseradish peroxidase, antibodies and etc. [1]. Therefore, in the course of our work, we obtained a stable variant of streptavidin to produce in *Escherichia coli* with a linker for chemical modification and conjugation.

Стрептавидин представляет собой гомотетрамерный, состоящий из четырех одинаковых субъединиц белок массой около 60 кДа. В природе этот белок экспрессируется в бактерии *Streptomyces avidinii*. Основным свойством стрептавидина является его высокое сродство к биотину (В7 или Н). Эта связь устойчива к различным детергентам, таким как SDS и Triton X-100, органическим растворителям, денатурантам и экстремальным значениям pH.

Его третичная и четвертичная структура может быть представлена как гомотетрамер, состоящий из четырех структур β-бочонков. В первую очередь высокое сродство к биотину обусловлено формированием большого количества Ван-дер-ваальсовых взаимодействий в области каталитического центра. Известно, что стрептавидин проявляет свою активность исключительно в тетрамерной форме, это связано с формированием гидрофобного кармана в области присоединения биотина. Таким образом, стрептавидину для проявления активности критически важно собираться в правильные четвертичные структуры [2].

Получение рекомбинантного стрептавидина

Генетическая последовательность стрептавидина была оптимизирована для экспрессии в *E. coli* и помещена в плазмидный вектор pET30b. Дополнительно к последовательности нативного белка с N-конца в генетическую конструкцию был добавлен линкер: SSGENLYFQGS. В качестве штамма продуцента был выбран штамм BL21. Последовательность линкера выбрана таким образом, чтобы содержать наиболее часто используемые для химической модификации аминокислоты. Содержащие аминокислоты: аспарагин и глутамин; содержащие карбоксильную группу: глутаминовая кислота. Кроме того, в линкере содержится тирозин, что позволяет внести радиоактивную метку йодом [3].

Для очистки белка использовался сорбент Ni-AZUR. Элюция стрептавидина происходила в буфере PBS 50mM pH 7, Tween 20 0,2 %, имидазол 500mM. В дальнейшем проводился диализ белка в буфер PBS 50mM pH 7, Tween 20 0,01 %.

Проверка активности стрептавидина в отношении биотина проводилась следующим образом.

1. На планшет в течение 2 ч при 37 °С сорбировавшийся биотинилированный альбумин, после чего планшет промывался PBS-T буфером.
2. В эти же лунки добавлялся стрептавидин в разных концентрациях, начиная от 10 мкг/мл до 0,64 нг/мл, и инкубировался в течение 30 мин. После инкубации лунки промывались PBS-T буфером.

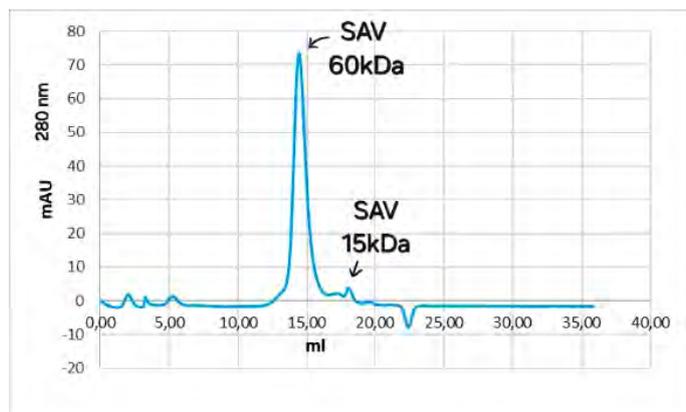


Рис. 1. Результат гель-фильтрации стрептавидина (SAV) на сорбенте Superose 12

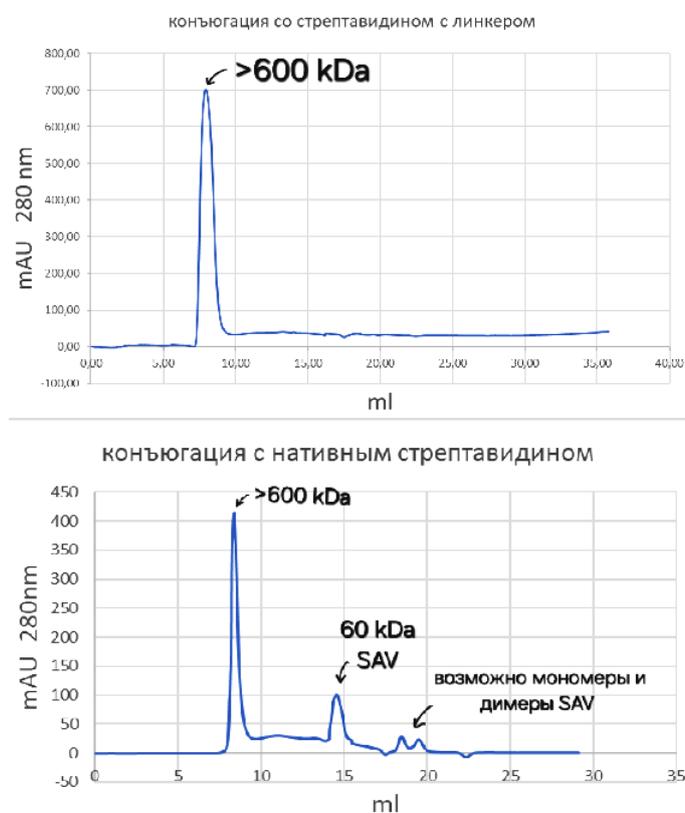


Рис. 2. Сравнение результата конъюгации нативного и модифицированного стрептавидина (SAV)

Литература

1. Dundas C. M., Demonte Daniel, Park S. Streptavidin-biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. Vol. 97. P. 9343–9353.
2. Weber P. C. et al. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin // *Sci.* 1989. Vol. 243 (4887). P. 85–88.
3. Hermanson G. T. *Bioconjugate techniques.* Academ. Press. 2013. P. 216.

3. Добавлялась бутилированная пероксидаза хрена 50 нг/мл и инкубировалась в течение 30 мин с последующей промывкой.

4. Для визуализации результата в лунки добавлялся ТМБ и инкубировался до проявления окраски в течение 15 мин, затем добавлялся стоп-реагент.

Результаты и обсуждения

После получения нескольких стабильных партий стрептавидина был проведен тест на сохранение активности при хранении на 37 °C в течение 2 месяцев. В результате оказалось, что белок не потерял свою активность, в отличие от коммерческого аналога, активность которого была снижена в 5 раз относительно изначальной. Кроме того, для проверки фолдинга белка и сборки его в тетрамерную форму была проведена гель-фильтрация на сорбенте Superose 12 (рис. 1). Видно, что стрептавидин практически полностью собирается в тетрамер.

Также для удобной транспортировки белка стрептавидин был лиофилизирован. После месяца хранения в сухом виде при комнатной температуре белок не потерял активность.

Так как в нашей работе отдельное внимание было уделено возможности конъюгации стрептавидина, для этого был разработан линкер, содержащий часто используемые для шивок аминокислоты. Для проверки вклада линкерной последовательности была проведена конъюгация через EDC в течение 2 ч при pH 4,9 в MES-буфере стрептавидина с аминированным декстраном [3]. В результате в сравнении со стрептавидином с нативной последовательностью аминокислот в тех же условиях удалось получить более высокий выход продукта (рис. 2). Оценка качества конъюгата проводилась по протоколу оценки активности стрептавидина, описанного ранее.

Таким образом, удалось получить пригодный для химической модификации стрептавидин.