

На правах рукописи



ЗАХАРОВА
Галина Сергеевна

**АНИОННАЯ ПЕРОКСИДАЗА ТАБАКА:
ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЕРМЕНТА
И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ КАК КОМПОНЕНТА
БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ**

03.01.06 – биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)
03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва - 2015

Работа выполнена в лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук и на кафедре химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научные руководители:

доктор химических наук, профессор

Тишков Владимир Иванович

кандидат химических наук

Полозников Андрей Александрович

Официальные оппоненты:

Туницкая Вера Леонидовна

доктор химических наук

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН,
ведущий научный сотрудник

Яненко Александр Степанович

доктор биологических наук, профессор

Федеральное государственное унитарное предприятие
“Государственный научно-исследовательский институт генетики и
селекции промышленных микроорганизмов”
заместитель директора по научной работе, заведующий
лабораторией

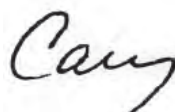
Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Защита диссертации состоится **27 октября 2015 года в 16 часов** на заседании Совета Д 501.001.59 по защите докторских и кандидатских диссертаций по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.11, МГУ, Химический факультет, кафедра химической энзимологии, аудитория 202.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и на сайте Химического факультета МГУ (www.chem.msu.ru).

Автореферат разослан « ____ » сентября 2015 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 501.001.59,
кандидат химических наук



Сакодынская И.К.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Анионная пероксидаза табака (ТОР, КФ 1.11.1.7) – это гем-содержащий фермент, относящийся к III классу суперсемейства пероксидаз растительного и грибного происхождения. Нативная ТОР – это мономерный гликопротеин, состоящий из двух доменов (дистального и проксимального по отношению к плоскости гема), структура которого поддерживается четырьмя дисульфидными связями и двумя кальций-связывающими центрами (по одному в каждом домене). ТОР катализирует окисление различных ароматических субстратов под действием пероксида водорода.

Среди ферментов, входящих в III класс растительных пероксидаз, наиболее хорошо изученным является изофермент С пероксидазы из корней хрена (HRP С). Этот фермент широко применяется на практике, в первую очередь в биоаналитических целях (в качестве метки для иммуноанализа, как компонент биосенсоров и т.д.). К достоинствам HRP С относятся её относительная дешевизна, доступность, довольно высокая стабильность и небольшой размер молекулы (последний фактор является важным параметром при получении иммуноконъюгатов для иммуногистохимического и иммуноцитохимического окрашивания). Тем не менее данный фермент не лишён ряда существенных недостатков, которые накладывают ограничения на его использование. К таким недостаткам, в первую очередь, относятся невысокая стабильность к инактивации пероксидом водорода, низкая эффективность прямого переноса электронов между активным центром фермента и поверхностью электрода в безмедиаторных биосенсорах и низкая активность в хемилюминесцентной реакции окисления люминола.

Проведенные в нашей лаборатории исследования показали, что ТОР превосходит HRP С по многим параметрам, однако практическое применение фермента напрямую зависит от возможности получать его в больших количествах. Так как выход активной ТОР при выделении из природного источника (*Nicotiana tabacum*) не превышал 5 мг с 1 кг листьев, в нашей лаборатории была создана система экспрессии рекомбинантного фермента в клетках *Escherichia coli*. В результате был получен штамм *E. coli* с высоким уровнем экспрессии рекомбинантной ТОР (около 45 % от суммарного клеточного белка). Но так как фермент экспрессировался в виде нерастворимых телец включения, для получения активной ТОР была также разработана методика ренатурации (рефолдинга) фермента *in vitro*. Разработанная методика позволила получить достаточное количество фермента для изучения основных свойств, однако эффективность рефолдинга была невысока (выход активной ТОР – около 3-10% от денатурированного апо-фермента). В этой связи актуальным представляется изучение влияния различных условий проведения ренатурации ТОР и их оптимизация для повышения выхода активного фермента. Помимо практического значения данная задача несомненно представляет и научный интерес, так как накопление данных в этой области позволит выявить фундаментальные основы протекания рефолдинга рекомбинантных белков в целом.

Основным применением пероксидаз на сегодняшний день является использование их в качестве ферментной метки. Меченные HRP С антитела применяются в различных иммунохимических методах, в первую очередь, в иммуноферментном анализе. Востребованность данного типа детектирующих систем во множестве областей (медицине, контроле качества продуктов, мониторинге состояния окружающей среды и др.) делает актуальным поиск путей улучшения характеристик иммуноанализа, в том

числе посредством поиска новых ферментных меток. Несмотря на то, что свойства TOP, обеспечивающие перспективность её использования для иммуноанализа (например, высокая активность TOP в реакции окисления люминола, значительно превосходящая таковую у HRP C), были достаточно подробно изучены, конъюгаты TOP с антителами получены не были. Поэтому важной задачей является выбор способов конъюгации TOP с антителами, получение меченных TOP антител и изучение их свойств при проведении иммуноанализа.

Ещё одним важным применением для различных оксидоредуктаз является их использование для создания биосенсоров. В последнее время большое внимание уделяется изучению т.н. безреагентных биосенсоров, основанных на прямом переносе электронов между активным центром фермента и поверхностью электрода. Прямой перенос электронов был обнаружен лишь у небольшого числа ферментов, в том числе для HRP C. Ранее в нашей лаборатории наличие прямого переноса электронов было показано и для TOP. Сравнение свойств данных ферментов показало, что TOP более стабильна к инаktivации пероксидом водорода, характеризуется большей эффективностью и скоростью прямого переноса электронов, а также обеспечивает более широкий линейный диапазон определения концентрации пероксида водорода по сравнению с HRP C. Однако при изучении электрохимических свойств TOP для иммобилизации фермента на поверхности электрода использовался метод физической адсорбции, который, как известно, может приводить к значительным конформационным изменениям в структуре фермента и его денатурации. В этой связи большой интерес представляет изучение других способов иммобилизации рекомбинантной TOP на поверхности электродов с целью улучшения электрокаталитических свойств фермента и характеристик биосенсора в целом.

Цели исследования. Целью данной работы являлась разработка методики получения рекомбинантной TOP с повышенной эффективностью рефолдинга, исследование свойств рекомбинантного фермента и изучение возможности его применения в качестве ферментной метки для иммуноанализа, а также как основного компонента безреагентных биосенсоров.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- оптимизация условий проведения рефолдинга рекомбинантной TOP для повышения выхода активного фермента;
- получение конъюгатов рекомбинантной TOP с антивидовыми антителами козы против IgG мыши и сравнение полученных конъюгатов с аналогичными, но содержащими HRP в качестве метки, при проведении иммуноферментного анализа с колориметрической и хемилюминесцентной детекцией;
- изучение влияния способа иммобилизации на электрохимические свойства рекомбинантной TOP при создании биосенсоров с прямым переносом электронов.

Научная новизна. В ходе выполнения данной работы впервые было проведено систематическое изучение влияния различных параметров на эффективность ренатурации рекомбинантной TOP *in vitro*. Показано, что наибольшее влияние на выход активной TOP при ренатурации из телец включения оказывает концентрация апофермента в рефолдинг-среде. Впервые для рефолдинга рекомбинантной пероксидазы был использован метод гель-фильтрации. Сравнение двух методов ренатурации (метода разведения и гель-фильтрации) показало, что рефолдинг TOP на гель-фильтрационной

колонке значительно менее эффективен. Изучено влияния ионов кальция на протекание рефолдинга и на свойства рекомбинантной TOP. Показано, что инкубация фермента в присутствии ионов кальция приводит к снижению каталитической активности по отношению к различным ароматическим субстратам. Впервые показан стабилизирующий эффект ионов кальция при термоинактивации TOP. Подобран метод и синтезированы конъюгаты TOP с антителами, которые были использованы для проведения иммуноанализа. Показано, что модификация аминокрупп TOP в процессе конъюгации не приводит к падению активности фермента. Впервые изучено влияние химической иммобилизации на электрохимические свойства TOP. Показано, что ковалентная иммобилизация TOP на поверхности графитового электрода позволяет существенно повысить отклик биосенсора и операционную стабильность фермента.

Практическая значимость работы. Оптимизация условий проведения рефолдинга рекомбинантной TOP позволила значительно увеличить выход активного фермента, что крайне важно с точки зрения возможности практического применения. Показано, что использование конъюгатов антител с рекомбинантной TOP дикого типа и мутантной формой TOP-F140Y приводит к повышению интенсивности сигнала при проведении иммуноанализа как с колориметрической регистрацией, так и с детекцией по хемилюминесценции, а также обеспечивает большую чувствительность анализа. Было достигнуто существенное улучшение характеристик безмедиаторного биосенсора на основе TOP (в частности, интенсивности электрокаталитического сигнала, операционной стабильности иммобилизованного фермента и ширины линейного диапазона определения пероксида водорода) при применении нового протокола химической иммобилизации фермента на поверхности графитового электрода.

Апробация работы. Основные результаты исследования были представлены на следующих международных конгрессах, конференциях и школах: VII и VIII Московский международный конгресс "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, Россия, 2013 и 2015), XIV Международная конференция молодых ученых «Леса Евразии» (Вологда, Россия, 2014), International BioForum-2014 (Пушино-на-Оке, Россия, 2014), 10th International Conference on Protein Stabilization (Стреза, Италия, 2014), International Conference OxiZymes (Вена, Австрия, 2014), XXI International Conference INPEC-2014 (International Network of Protein Engineering Centers) (Санкт-Петербург, Россия, 2014), International Conference "Biocatalysis 2015: Fundamentals and Applications" (Московская область, Россия, 2015).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 12 печатных работ: 3 статьи (все журналы входят в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ) и 9 тезисов докладов конференций.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 159 страницах и содержит 70 рисунков, 9 таблиц и 260 ссылок.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

В данной работе представлены результаты экспериментов по повышению продукции рекомбинантной пероксидазы табака (rTOP) в клетках *E. coli* и эффективности ренатурации rTOP *in vitro*, изучению влияния ионов кальция на свойства фермента, а

также данные по биотехнологическому применению гТОР (в качестве ферментной метки для иммуноанализа и в качестве компонента для создания безреагентных биосенсоров).

Модификация условий экспрессии рекомбинантной пероксидазы табака.

На первом этапе работы было изучено влияние ряда параметров культивирования на экспрессию гТОР. Было проведено сравнение экспрессии гТОР в двух штаммах *E. coli* - BL21(DE3)CodonPlus/pLysS и Rosetta(DE3)/pLysS при разном времени внесения индуктора (ИПТГ) и температуре культивирования после индукции (20 или 27 °С).

Данные по количеству биомассы и содержанию гТОР через 21 час после индукции приведены в таблице 1. Наибольший выход гТОР был получен при использовании в качестве продуцента штамма *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus/pLysS, добавлении ИПТГ в культуральную среду при $A_{600} = 1,0$ и последующем культивировании клеток при 20°С в течение 20-24 часов.

Таблица 1

Сравнение выходов рекомбинантной пероксидазы табака при различных условиях культивирования штаммов-продуцентов через 21 час после внесения индуктора.

Условия культивирования		<i>E. coli</i> BL21(DE3)CodonPlus/pLysS		<i>E. coli</i> Rosetta(DE3)/pLysS	
		A_{600}	Выход гТОР, мг/л среды	A_{600}	Выход гТОР, мг/л среды
27°С	Индукция при $A_{600} = 0,6$	8,3	44	5,3	52
	Индукция при $A_{600} = 1$	7,5	82	6,1	71
20°С	Индукция при $A_{600} = 0,6$	7,3	68	6,0	56
	Индукция при $A_{600} = 1$	7,4	105	6,4	36

После выбора штамма-продуцента и условий его культивирования было изучено влияние добавления в питательную среду фосфатов и глицерина на выход гТОР. Внесение фосфатов и глицерина позволило повысить выход биомассы примерно в 1,5 раза (табл. 2). При этом выход гТОР с 1 литра культуральной среды увеличился в 4 раза. Таким образом, было показано, что использование модифицированной среды 2хУТ (16 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л хлорида натрия, 1,5 г/л K_2HPO_4 ; 1 г/л Na_2HPO_4 , 1 % глицерина) позволяет значительно повысить выход апофермента.

Таблица 2

Выходы биомассы и рекомбинантной пероксидазы табака через 10 часов культивирования (после индукции) штамма-продуцента *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)pLysS в питательной среде различного состава.

Состав питательной среды		A_{600}	Выход гТОР, мг/л среды
без глицерина	среда 2хУТ	4,5	47,4
	среда 2хУТ; 0,625 г/л K_2HPO_4 ; 0,375 г/л Na_2HPO_4	5,9	82,7
	среда 2хУТ; 1,5 г/л K_2HPO_4 ; 1 г/л Na_2HPO_4	6,4	160,8
1% глицерина	среда 2хУТ	4,7	49,8
	среда 2хУТ; 0,625 г/л K_2HPO_4 ; 0,375 г/л Na_2HPO_4	5,9	90,8
	среда 2хУТ; 1,5 г/л K_2HPO_4 ; 1 г/л Na_2HPO_4	6,6	194,2

Оптимизация условий рефолдинга рекомбинантной пероксидазы табака дикого типа методом разведения.

Полученная биомасса была разрушена ультразвуком, тельца включения отмыты и солюбилизированы в 6 М растворе мочевины, 1 мМ дитиотреитола. Доля апо-гТОР в отмытых тельцах включения составляла 80-85 %. Ренатурацию апо-фермента осуществляли методом разведения денатурированной гТОР в среде для рефолдинга. Оптимизацию условий рефолдинга проводили на основании базового протокола, описанного далее. Солюбилизированный в 6 М мочеvine апо-фермент добавляли по каплям при перемешивании к 10 мл охлаждённой до 4°C среды для рефолдинга следующего состава: 1,8 М мочевина, 5 мМ CaCl₂, 0,1 мМ дитиотреитол, 0,5 мМ окисленный глутатион, 5 % глицерин в 50 мМ Tris-HCl (pH 9,5). После 24-часовой инкубации при 4 °С в рефолдинг-среду вносили гемин до конечной концентрации 5 мкМ. В процессе оптимизации условий рефолдинга гТОР варьировали такие параметры, как pH, концентрация мочевины, дитиотреитола, окисленного глутатиона, апо-фермента, а также время добавления и концентрацию гемина. Мониторинг ренатурации гТОР осуществляли путём измерения каталитической активности по отношению к АБТС.

Влияние концентрации окисленного глутатиона и дитиотреитола на выход активной пероксидазы табака при рефолдинге

Образование внутримолекулярных дисульфидных связей в процессе рефолдинга является одним из ключевых факторов, определяющих формирование и поддержание правильной конформации гТОР. В то же время наличие восьми остатков Cys в гТОР повышает вероятность формирования межмолекулярных S-S-связей, что приводит к агрегации белка и снижению выхода активной гТОР. Внесение в рефолдинг-среду смеси восстанавливающих и окисляющих тиоловых реагентов, таких как окисленный глутатион (GSSG) и дитиотреитол (DTT), способствует образованию нативных дисульфидных связей.

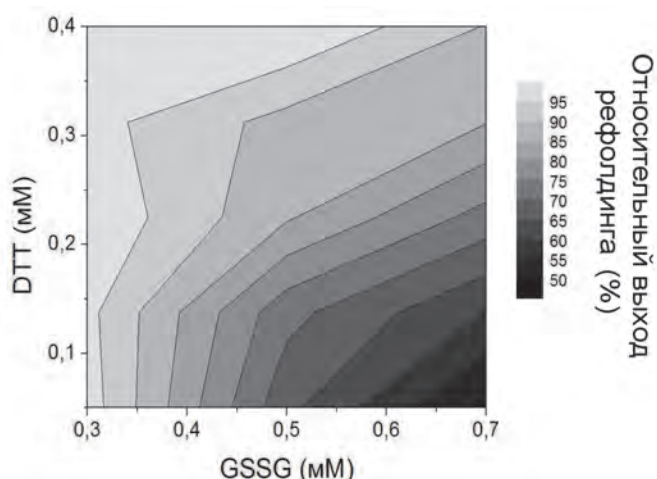


Рис. 1. Влияние концентрации дитиотреитола (DTT) и окисленного глутатиона (GSSG) на выход активной гТОР при рефолдинге методом разведения.

Для изучения влияния GSSG и DTT на эффективность рефолдинга гТОР их концентрации варьировали в диапазоне 0,3 - 0,7 и 0,05 - 0,4 мМ, соответственно. Максимальный выход активности наблюдался при минимальной из использованных концентраций GSSG (рис. 1). При этом выход активного фермента был примерно на 35% больше по сравнению с ранее использовавшейся методикой. Так как выход активной гТОР при 0,3 мМ GSSG практически не зависел от концентрации DTT, для дальнейших экспериментов по оптимизации ренатурации гТОР использовались концентрации GSSG и DTT, равные 0,3 и 0,05 мМ, соответственно.

Влияние pH на эффективность рефолдинга гТОР

Значение pH также влияет на образование S-S-связей, так как при щелочных значениях pH происходит формирование реакционноспособного тиолат-аниона.

Оптимальные значения pH для рефолдинга различных пероксидаз лежат в щелочной области. Поэтому для оптимизации состава рефолдинг-среды был выбран диапазон pH 8,0 - 9,6. Наибольший выход по активности был получен при максимальном из исследованных значений pH, равном 9,6 (рис. 2).

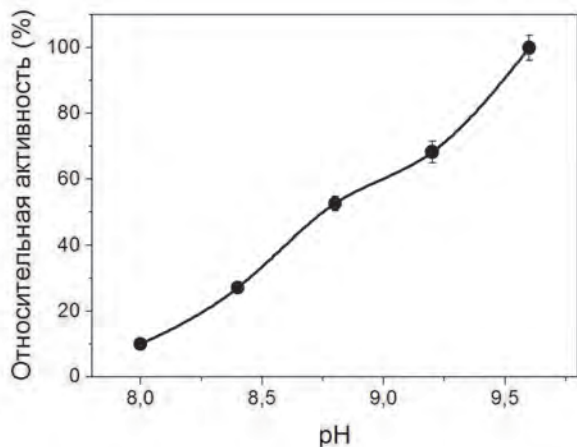


Рис. 2. Влияние pH на выход активной гТОР при рефолдинге методом разведения.

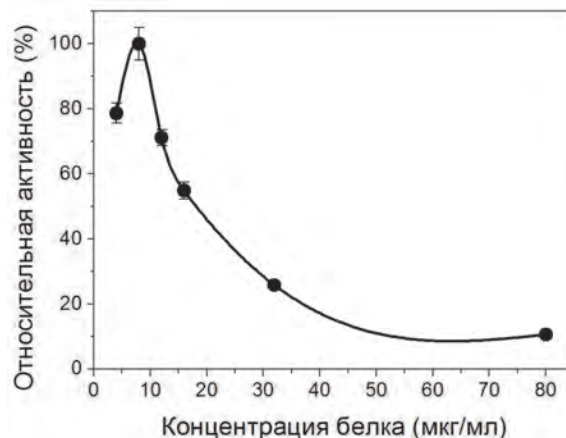


Рис. 3. Влияние концентрации белка в рефолдинг-среде на выход активной гТОР.

Влияние концентрации белка на эффективность рефолдинга гТОР

Концентрация белка является одним из ключевых факторов, определяющих эффективность ренатурации, так как её снижение позволяет существенно уменьшить потери фермента в результате агрегации. Как правило, концентрация белка при проведении рефолдинга составляет 10 - 100 мкг/мл. Для определения оптимального разведения апо-фермента ренатурация гТОР была проведена при различных концентрациях белка (4-80 мкг/мл). Максимальный выход активной гТОР был получен при концентрации белка около 8 мкг/мл (рис. 3). При этом снижение концентрации белка в рефолдинг-среде в 12 раз по сравнению с ранее использовавшейся (со 100 до 8 мкг/мл) позволяет повысить выход активного фермента на порядок.

Влияние концентрации мочевины на эффективность рефолдинга гТОР

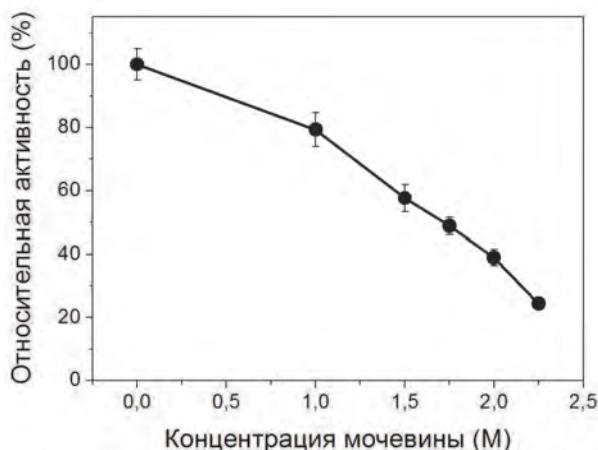


Рис. 4. Влияние концентрации мочевины в рефолдинг-среде на выход активной гТОР.

Присутствие в среде для рефолдинга хаотропных агентов в небольших концентрациях позволяет повысить эффективность ренатурации за счет разрыва нековалентных связей между отдельными молекулами белка, уменьшая агрегацию. Также хаотропные агенты поддерживают целевой белок в растворимой и подвижной форме. Оптимальная концентрация мочевины в рефолдинг-среде для различных пероксидаз варьируется в широких пределах (от 0,15 до 2 М). Ранее для гТОР наибольший выход активного фермента был получен при концентрации мочевины 1,8 М. В рамках данной работы для изучения влияния концентрации мочевины на эффективность рефолдинга гТОР был выбран диапазон 0 - 2,25 М

Наибольший выход по активности был получен в случае, когда мочевины в рефолдинг-среду не добавлялась, а вносилась только с раствором солюбилизированного белка (рис. 4). Таким образом, конечная концентрация мочевины в среде для рефолдинга составляла около 60 мМ. Столь заметное снижение оптимальной концентрации мочевины по сравнению с ранее применявшейся методикой, по-видимому, связано с уменьшением агрегации из-за снижения концентрации белка в рефолдинг-среде.

Влияние концентрации гемина и времени его добавления на эффективность ренатурации рекомбинантной пероксидазы табака

Гем играет ключевую роль в проявлении каталитической активности. Поэтому при ренатурации его необходимо вносить в рефолдинг-среду. Для HRP было показано, что внесение гемина после предварительной инкубации апо-фермента в рефолдинг-среде позволяет увеличить выход активного фермента. Ранее в нашей лаборатории также был проведён аналогичный эксперимент с гТОР и было показано, что при внесении гемина через 24 ч нахождения апо-фермента в рефолдинг-среде, выход активного фермента оказался выше примерно на 30 %. В данной работе была проверена возможность дальнейшего повышения эффективности рефолдинга гТОР при увеличении продолжительности предварительной инкубации апо-фермента в среде для рефолдинга (рис. 5А). Из рисунка видно, что увеличение периода инкубации апо-гТОР в рефолдинг-среде перед внесением гемина с 24 до 96 часов не оказывает влияния на выход активного фермента. Также было установлено, что снижение концентрации гемина с 5 до 1 мкМ (молярное соотношение апо-фермент : гемин - 1 : 4,5) не отражается на эффективности ренатурации гТОР. После внесения гемина в среду для рефолдинга каталитическая активность достигает максимума через 20 часов и может сохраняться при 4 °С без потерь в течение как минимум недели (рис. 5Б), что позволяет в дальнейшем спокойно проводить очистку фермента без потери его активности.

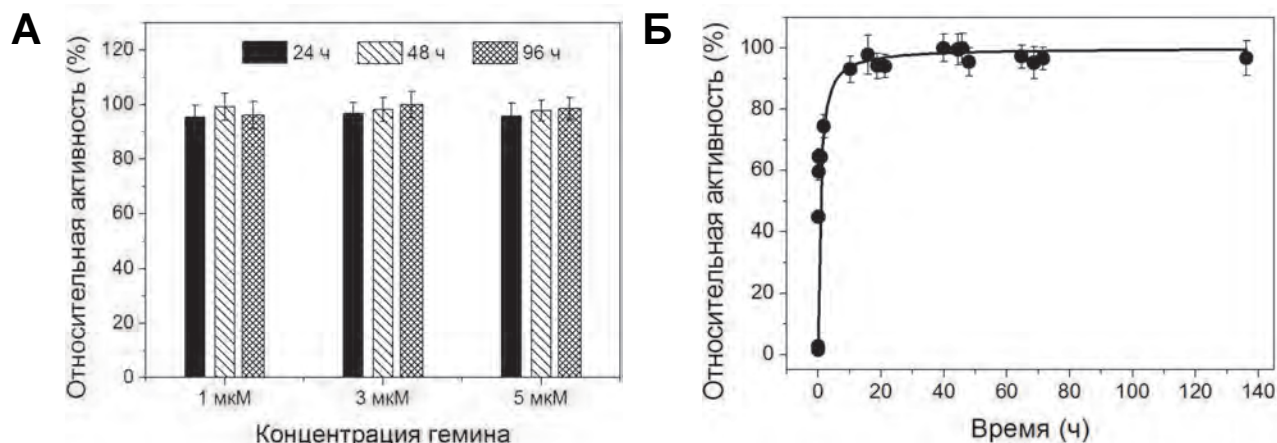


Рис. 5. А. Влияние концентрации гемина и времени его добавления в рефолдинг-среду на эффективность реактивации гТОР. **Б.** Рост каталитической активности в рефолдинг-среде после внесения гемина.

Влияние концентрации Ca^{2+} на рефолдинг гТОР

Критически важная роль Ca^{2+} в поддержании стабильности и активности была показана для множества растительных пероксидаз III класса. Поэтому при оптимизации условий рефолдинга гТОР было изучено также влияние концентрации ионов Ca^{2+} на эффективность ренатурации *in vitro*. Показано, что снижение концентрации CaCl_2 в среде для рефолдинга приводит к повышению выхода по каталитической активности (рис. 6).

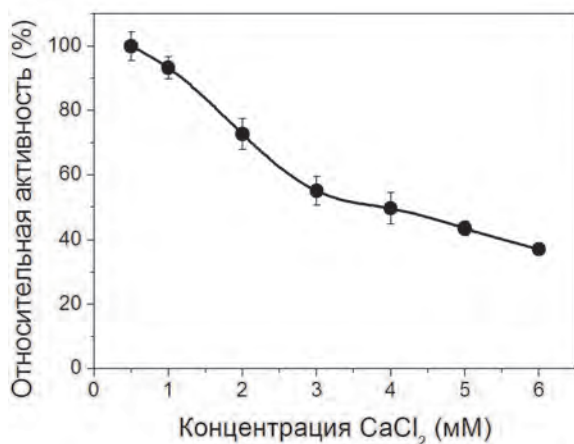


Рис. 6. Влияние концентрации ионов кальция на рефолдинг гТОР.

В процессе оптимизации рефолдинга гТОР в данной работе было показано, что выход по активности падает с увеличением концентрации CaCl₂ в рефолдинг-среде.

Изучение влияния ионов кальция на свойства гТОР показало, что инкубация фермента в среде, содержащей CaCl₂, приводит к падению его активности по отношению к различным субстратам (рис. 7). Так как гТОР на своей поверхности имеет большое количество отрицательно заряженных групп, данный эффект может быть вызван неспецифическим связыванием Ca²⁺, что может приводить к конформационным изменениям в области активного центра и субстрат-связывающей области.

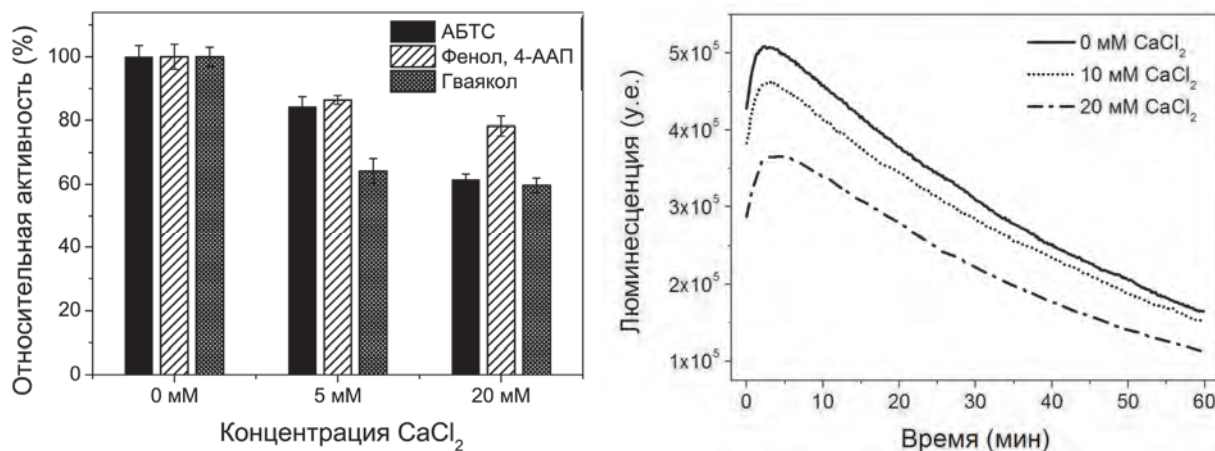


Рис. 7. Влияние концентрации CaCl₂ на активность гТОР по отношению к АБТС, фенолу и гваяколу (слева) и люминолу (справа).

Однако, инкубация гТОР в присутствии ионов кальция в концентрации 5 мМ приводит к снижению активности по отношению к АБТС всего на 15% (рис. 7), в то время, как при рефолдинге снижение выхода активного фермента, определяемого по тому же субстрату, составляло около 60% (рис. 6). Следовательно, присутствие ионов кальция оказывает большое влияние на протекание именно на процесс фолдинга гТОР.

Исследование зависимости температурной стабильности гТОР от концентрации ионов кальция (1-20 мМ) показало, что в этом случае внесение CaCl₂ оказывает стабилизирующее действие на фермент (рис. 8). При этом максимальный эффект достигается при концентрации CaCl₂ 5 мМ. Ранее для различных растительных пероксидаз II и III классов было показано, что при термоинактивации происходит диссоциация эндогенных ионов кальция, поддерживающих структуру фермента.

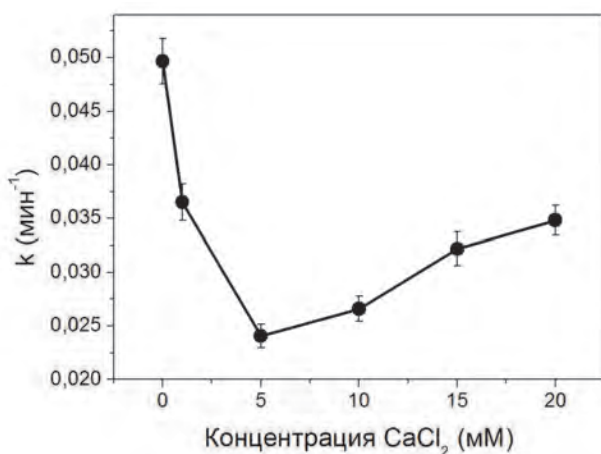


Рис. 8. Влияние концентрации CaCl₂ на константу скорости термоинактивации гТОР при 52°C.

Вероятно, добавление Ca²⁺ в среду позволяет компенсировать этот процесс. Стабилизирующий эффект добавления CaCl₂ может быть объяснён также компактизацией структуры гТОР вследствие неспецифического связывания ионов кальция.

Рефолдинг пероксидазы табака с использованием гель-фильтрации

Хроматографические методы часто используются для рефолдинга рекомбинантных белков. В частности, рефолдинг рекомбинантных белков может проводиться с помощью гель-фильтрации. Данный метод является более экспрессным по сравнению с методом разведения и в некоторых случаях позволяет использовать высокие концентрации белка. Также при проведении рефолдинга на гель-фильтрационной колонке происходит одновременная очистка ренатурированного целевого белка от белковых агрегатов и низкомолекулярных примесей.

Нами было проведено сравнение методов разведения и гель-фильтрационной хроматографии при рефолдинге гТОР. При проведении рефолдинга на гель-фильтрационной колонке варьировали некоторые параметры процесса, такие как концентрация белка, наносимого на колонку, скорость потока и время добавления гемина. Во всех случаях на хроматограммах присутствовали два пика (рис. 9А). Для определения их природы был проведён аналитический электрофорез полученных фракций в денатурирующих условиях. Было показано, что первый пик соответствует практически чистой денатурированной гТОР (рис. 9Б, дорожка 1). На рис. 9А также показаны максимальные значения ферментативной активности, полученные для каждой фракции через 12 часов после добавления гемина. Для сравнения со стандартным протоколом для каждой хроматографии была использована суммарная активность всех фракций.

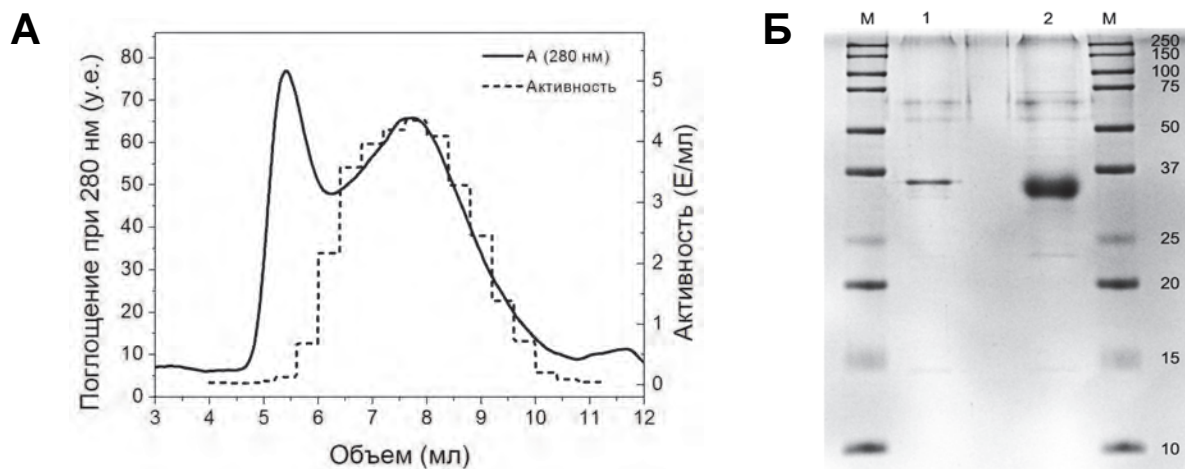


Рис. 9. А. Профиль элюции при рефолдинге гТОР на гель-фильтрационной колонке. **Б.** Электрофореграмма фракций, собранных в ходе рефолдинга гТОР с использованием гель-фильтрации. **М** – маркеры молекулярного веса (кДа); **1** – первый пик; **2** – второй пик.

Показано, что на эффективность рефолдинга гТОР при использовании гель-фильтрации оказывают влияние все исследованные параметры. Однако самое заметное влияние оказывает внесение гемина в хроматографические фракции после предварительной 24-часовой инкубации при 4°C (табл. 3). Сравнение выходов активного фермента в ходе рефолдинга гТОР при использовании гель-фильтрации и метода разведения показало, что метод разведения является намного более эффективным.

Таблица 3

Сравнение относительных эффективностей реактивации гТОР при использовании различных методов рефолдинга. За 100% была принята эффективность, полученная при использовании метода разведения при внесении гемина через 24 ч после апо-фермента.

Условия проведения рефолдинга рекомбинантной пероксидазы табака	Относительная эффективность рефолдинга, %
<i>Метод разведения №1.</i> Конечная концентрация белка – 16 мкг/мл; гемин (5 мкМ) добавлен через 30 минут после внесения белка в рефолдинг-среду	68,2
<i>Метод разведения №2.</i> Конечная концентрация белка – 16 мкг/мл; гемин (5 мкМ) добавлен через 24 часа после внесения белка в рефолдинг-среду	100
<i>Гель-фильтрация №1.</i> Начальная концентрация белка – 0,8 мг/мл; скорость потока – 0,4 мл/мин; объем фракций – 0,4 мл; гемин (5 мкМ) добавлен в каждую фракцию сразу после завершения хроматографии.	8,6
<i>Гель-фильтрация №2.</i> Начальная концентрация белка – 0,2 мг/мл; скорость потока – 0,4 мл/мин; объем фракций – 0,4 мл; гемин (5 мкМ) добавлен в каждую фракцию сразу после завершения хроматографии.	20,9
<i>Гель-фильтрация №3.</i> Начальная концентрация белка – 0,8 мг/мл; скорость потока – 0,2 мл/мин; объем фракций – 0,4 мл; гемин (5 мкМ) добавлен в каждую фракцию сразу после завершения хроматографии.	14,1
<i>Гель-фильтрация №4.</i> Начальная концентрация белка – 0,8 мг/мл; скорость потока – 0,2 мл/мин; объем фракций – 0,4 мл; гемин (5 мкМ) добавлен в каждую фракцию через 24 часа после завершения хроматографии.	34,9

Наработка и очистка рекомбинантной пероксидазы табака

Для получения достаточного количества фермента для дальнейших экспериментов было проведено препаративное культивирование штамма-продуцента гТОР и рефолдинг фермента по оптимизированной методике. В таблице 4 приведены основные показатели, полученные в ходе выделения, рефолдинга и очистки гТОР.

Таблица 4

Параметры получения рекомбинантной пероксидазы табака дикого типа с использованием оптимизированной методики рефолдинга (показатели приведены в расчёте на 1 л культуральной среды).

Стадия	Суммарный белок, мг	гТОР, мг	Эффективность рефолдинга, %	Суммарная активность, Е	Удельная активность, Е/мг
Осадок клеток <i>E. coli</i>	260	104	—	—	—
Отмытые тельца включения	110	93,5	—	—	—
Реактивированная гТОР	—	79,0	84,5	324 700	2 950
Очищенный фермент	—	56,6	—	232 700	4 100

Оптимизация условий рефолдинга гТОР позволила повысить его эффективность в 6 раз по сравнению с ранее использовавшейся методикой. Достигнутая эффективность рефолдинга (около 85%) является самой высокой из описанных в литературе для

рекомбинантных пероксидаз и одной из самых высоких для рекомбинантных белков, экспрессируемых в *E. coli*, в целом. Выход реактивированной гТОР после концентрирования и двух стадий очистки составил около 57 мг на 1 литр культуральной среды.

Рекомбинантная пероксидаза табака как ферментная метка для иммуноанализа

В настоящее время всё большее применение на практике находит метод хемилюминесцентного иммуноанализа, основанный на измерении свечения, возникающего при протекании химической реакции. В большинстве иммуноферментных диагностических систем в качестве ферментной метки выступает HRP C, при этом в качестве субстрата чаще всего используется люминол. Так как активность HRP C по отношению к люминолу невысока, для усиления интенсивности сигнала в реакционную смесь добавляют т.н. «усилители хемилюминесценции». В качестве таких усилителей могут выступать различные ароматические амины, нафтолы, фенотиазины и фенолы (на практике в качестве усилителя часто выступает *p*-йодфенол). В отличие от HRP C, ТОР проявляет высокую активность по отношению к люминолу даже в отсутствии усилителей, что делает перспективным её использование в качестве ферментной метки для иммуноанализа. Полученная ранее в нашей лаборатории мутантная форма гТОР-F140Y менее активна по отношению к люминолу, однако более стабильна к инактивации пероксидом водорода, что в свою очередь обеспечивает большую стабильность хемилюминесцентного сигнала. Поэтому гТОР-F140Y также была наработана с использованием оптимизированной методики рефолдинга и после очистки использована для синтеза конъюгата с антителами.

Получение конъюгатов рекомбинантной пероксидазы табака с антителами

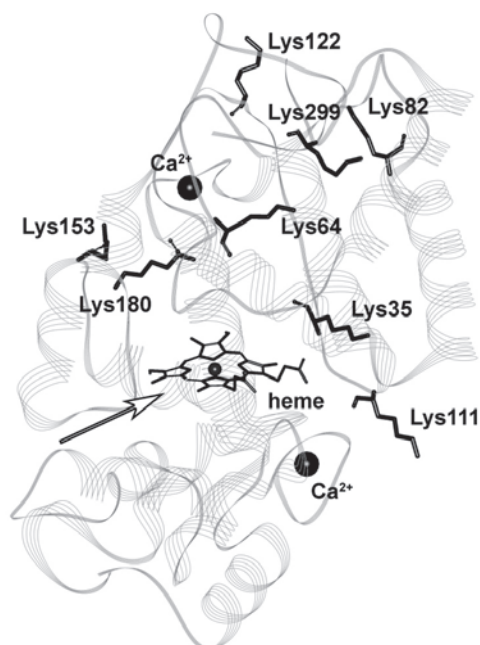


Рис. 10. Положение остатков лизина в ТОР. Стрелкой показан вход в активный центр фермента.

Для получения конъюгатов нативной HRP C с антителами обычно используют метод периодатного окисления. Однако рекомбинантная пероксидаза табака не гликозилирована, поэтому для синтеза конъюгатов антител с гТОР и гТОР-F140Y был выбран способ модификации аминогрупп. На рис. 10 приведена трёхмерная структура гТОР, на которой отмечено положение остатков лизина. Все остатки Lys (положения 35, 64, 82, 111, 122, 153, 180 и 299) находятся на противоположной от входа в активный центр стороне молекулы, что снижает вероятность потери активности фермента при его химической модификации в результате возникновения стерических затруднений для молекул субстрата.

Для синтеза конъюгатов был выбран метод с использованием сульфо-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)цикло-гексан-1-карбоксилата (sulfo-SMCC) и N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетата (SATA). Полученные конъюгаты гТОР-IgG и гТОР-F140Y-IgG использовали далее для проведения иммуноанализа.

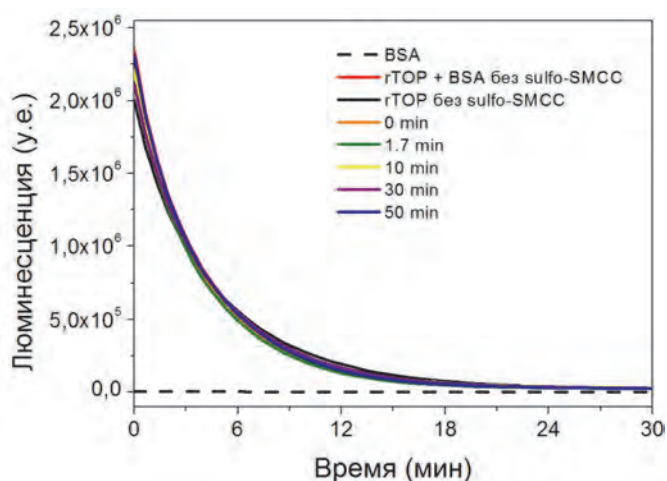


Рис. 11. Влияние химической модификаций sulfo-SMCC на каталитические свойства гТОР в реакции окисления люминола.

модификацию фермента. После этого измеряли активность гТОР по отношению к люминолу. Результаты эксперимента показали, что sulfo-SMCC не влияет на каталитические свойства гТОР (рис. 11).

Иммуноферментный анализ с использованием конъюгатов рекомбинантной пероксидазы табака с антителами

При проведении ИФА с использованием синтезированных конъюгатов антител с гТОР дикого типа и мутанта гТОР-F140Y детекцию сигнала осуществляли двумя методами: колориметрическим и люминометрическим. Для сравнения был проведён анализ с использованием конъюгата HRP-IgG. За основу был взят коммерческий набор для определения содержания иммуноглобулинов мыши FastELISA фирмы «RD-Biotech» (Франция). Выбор данной тест-системы был обусловлен как доступностью иммунореагентов, так и широким применением данного анализа на практике.

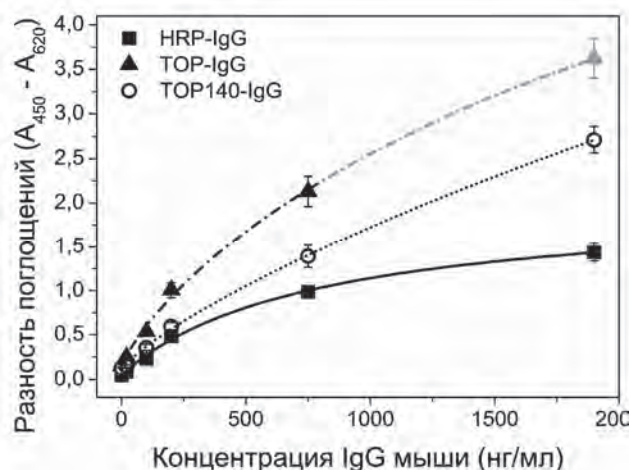


Рис. 12. Калибровочные кривые для определения содержания IgG мыши методом «сэндвич»-иммуноанализа с колориметрической детекцией, полученные при использовании конъюгатов антител козы против IgG мыши с пероксидазой хрена (HRP-IgG) и рекомбинантной пероксидазой табака (дикого типа – гТОР-IgG или мутантной формы – гТОР-F140Y-IgG).

Так как в ходе химической модификации фермента может происходить потеря каталитической активности, было изучено влияние модификации аминокрупп гТОР с использованием sulfo-SMCC на активность по отношению к люминолу. Фермент инкубировали вместе с sulfo-SMCC при комнатной температуре, через определённые промежутки времени, отбирали аликвоты и переносили их в пробирки с 50-кратным по отношению к гТОР избытком бычьего сывороточного альбумина, чтобы остановить

Анализ содержания IgG мыши с колориметрической детекцией проводили в соответствии с инструкцией производителя. Использование меченных рекомбинантной пероксидазой табака антител привело к увеличению уровня детектируемого сигнала в 3 и 2 раза в случае фермента дикого типа гТОР или его мутантной формы гТОР-F140Y, соответственно. Кроме того, гТОР-IgG обеспечивает большую чувствительность определения концентрации IgG мыши во всем исследованном диапазоне, а гТОР-F140Y-IgG – в области высоких концентраций анализатора (> 500 нг/мл) по сравнению с HRP-IgG (рис. 12).

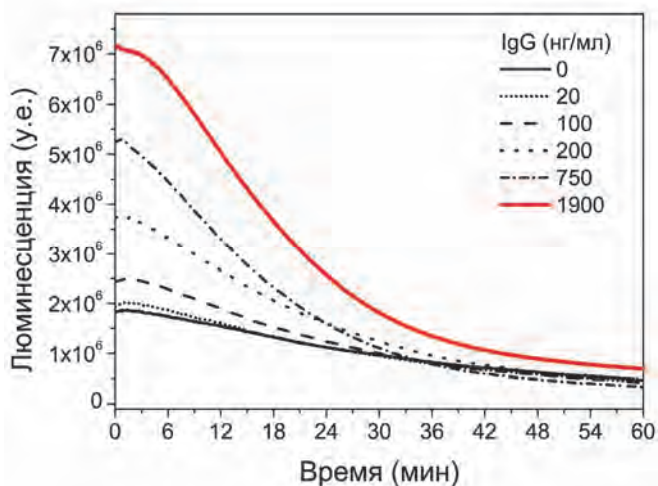


Рис. 13. Кинетические кривые изменения интенсивности люминесценции, полученные при определении различных концентраций IgG мыши (20-1900 нг/мл) методом хемилюминесцентного иммуноанализа с использованием конъюгата HRP-IgG.

инициировали внесением 50 мкл 10 мМ H_2O_2 , после чего измеряли интенсивность люминесценции в течение 1 часа (рис. 13 и 14).

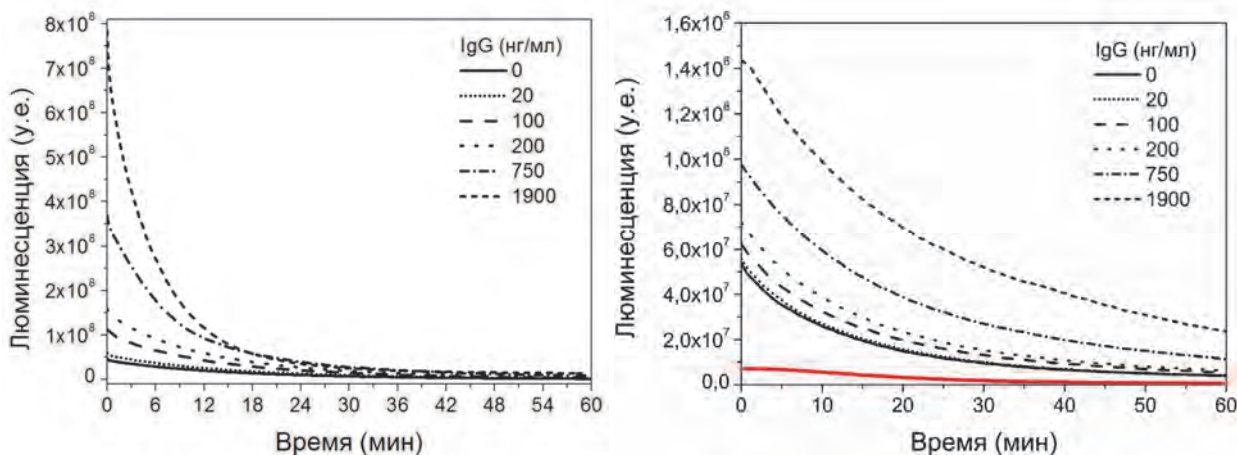


Рис. 14. Кинетические кривые изменения интенсивности люминесценции, полученные при определении различных концентраций IgG мыши (20-1900 нг/мл) методом хемилюминесцентного иммуноанализа с использованием конъюгата rTOP-IgG (слева) и rTOP-F140Y-IgG (справа; для сравнения красным цветом показана кривая изменения интенсивности люминесценции для HRP-IgG).

Интенсивность люминесценции в случае rTOP-IgG была в 110 раз выше по сравнению с HRP-IgG, а при использовании rTOP-F140Y-IgG – в 20 раз выше. В то же время в случае rTOP-F140Y-IgG сигнал был более стабильный по сравнению с rTOP-IgG, а наклон калибровочной кривой в течение 15 минут практически не изменялся.

Для сравнения калибровочных кривых были использованы значения интегральной люминесценции за первые 15 мин после начала реакции (рис. 15). Наибольшее соотношение сигнал-шум было получено в случае синтезированного конъюгата rTOP-IgG, в то время как для rTOP-F140Y, несмотря на большую интенсивность сигнала, соотношение сигнал-шум было таким же, как и при использовании HRP-IgG.

Аналогично был проведён ИФА для определения содержания IgG мыши с хемилюминесцентной детекцией. Для этого был использован белый непрозрачный полистироловый планшет с преадсорбированными антимышиными антителами. Для конъюгатов rTOP-IgG и rTOP-F140Y-IgG субстратная смесь включала 175 мкл 0,1 М Tris-HCl буфера (pH 8,3) и 25 мкл 10 мМ люминола. Для конъюгата HRP-IgG – 150 мкл 0,1 М Tris-HCl буфера (pH 8,5), 25 мкл 10 мМ люминола и 25 мкл 10 мМ *p*-йодфенола в качестве усилителя хемилюминесценции. Реакцию

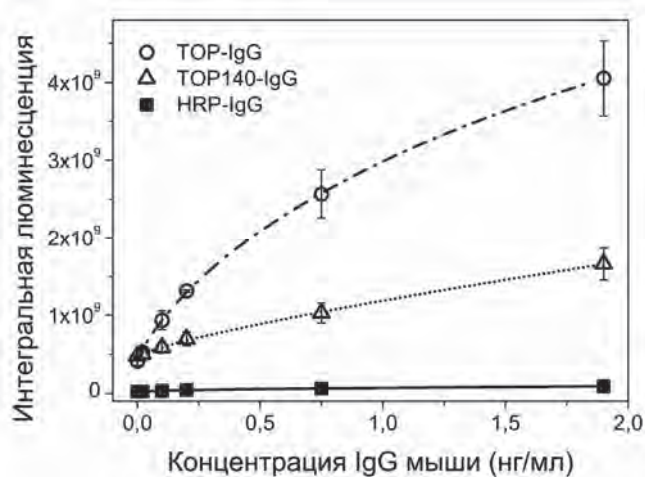


Рис. 15. Калибровочные кривые для определения содержания IgG мыши методом «сэндвич»-иммуноанализа с детекцией по люминесценции, полученные при использовании конъюгатов антител козы против IgG мыши с пероксидазой хрена (HRP-IgG) и рекомбинантной пероксидазой табака (дикого типа – rTOP-IgG или мутантной формы – rTOP-F140Y-IgG). Для построения был использован интеграл люминесценции за 15 мин.

Использование пероксидазы табака в качестве ферментной метки также обеспечивает лучшую чувствительность определения аналита: в области низких концентраций чувствительность анализа в случае rTOP-IgG и rTOP-F140Y-IgG по сравнению с HRP-IgG была выше в 49 и 11 раз, соответственно; в области высоких концентраций – в 54 и 23 раза. Высокая чувствительность анализа при больших концентрациях IgG мыши на практике позволит избежать предварительного разведения образцов перед проведением анализа.

Таким образом, рекомбинантная пероксидаза табака (как дикого типа, так и с заменой F140Y) является перспективной альтернативой пероксидазе из корней хрена в качестве ферментной метки для иммуноанализа.

Влияние метода иммобилизации на электрокаталитическую активность рекомбинантной пероксидазы табака и свойства безреагентного биосенсора

В предыдущие годы были определены параметры прямого переноса электронов при иммобилизации TOP как на графитовом, так и на золотом электроде. Однако для иммобилизации фермента использовался метод физической адсорбции, который, является обратимым и, как известно, после связывания фермента на поверхности электрода могут происходить существенные конформационные изменения в структуре белка и даже его денатурация. Поэтому в данной работе, выполненной совместно с лабораторией д-ра Rafael Andreu (факультет физической химии Севильского университета, Испания), было изучено влияние химической иммобилизации на свойства rTOP и получены характеристики безреагентных биосенсоров на её основе.

Фермент иммобилизовали тремя различными методами: 1) с помощью физической адсорбции; 2) с использованием стандартного карбодиимидного метода, который включает активацию поверхности электрода при нанесении 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDAC) и N-гидроксисульфосукцинимид натрия (sulfo-NHS), инкубацию при 4 °C, отмывку электрода, нанесение раствора фермента, инкубацию и финальную отмывку электрода; 3) модифицированный метод химической иммобилизации, в котором была исключена промежуточная стадия отмывки электрода и фермент наносился одновременно с EDAC и sulfo-NHS.

На рис. 16 представлены циклические вольтамперограммы (ЦВА), полученные при различных скоростях развёртки потенциала, для rTOP, иммобилизованной путём физической адсорбции на графитовом электроде.

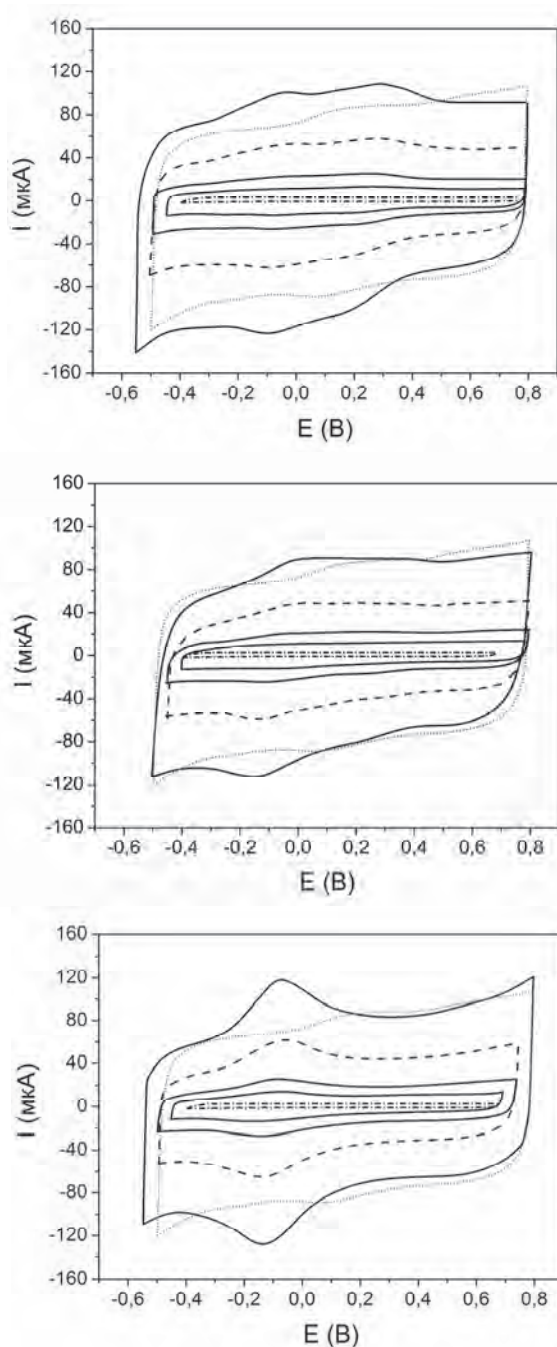


Рис. 16. Циклические вольтамперограммы (ЦВА), полученные для γ TOP, иммобилизованной разными способами на электроде, при различных скоростях развёртки: 0,1 (штрихпунктирная линия); 1; 2; 5 (пунктирная линия) и 10 В/с. Серая пунктирная линия показывает вольтамперограмму, полученную при скорости развёртки 10 В/с, для электрода без иммобилизованного фермента. Значения потенциала указаны по отношению к СВЭ. **А** – физическая адсорбция; **Б** – карбодиимидный метод с отмывкой активированного электрода от EDAC и sulfo-NHS; **В** – карбодиимидный метод при одновременном нанесении γ TOP, EDAC и sulfo-NHS.

уменьшению расстояния между ними: $\Delta E_p = 135$ мВ при скорости развёртки 100 В/с, $E_{1/2} = -100$ мВ по отношению к СВЭ. Характеристики прямого переноса электронов при различных способах иммобилизации γ TOP приведены в таблице 5. Полученные данные

А

Видно, что на ЦВА присутствуют две волны, одна из которых (в районе 200 мВ по отношению к стандартному водородному электроду – СВЭ) присутствует и на ЦВА, полученной для электрода без иммобилизованного фермента. Наличие этого перехода, по-видимому, обусловлено присутствием хиновых групп на поверхности графитового электрода. Вторая волна фиксировалась только в присутствии γ TOP, то есть она соответствует переходу Fe^{3+}/Fe^{2+} . Потенциал полуволны $E_{1/2}$ для этого перехода составлял около -80 мВ по отношению к СВЭ. Малое расстояние между анодным и катодным пиками ($\Delta E_p = 160$ мВ при скорости развёртки 100 В/с) говорит о высокой скорости электронного обмена.

Б

В

Близкие характеристики электродного процесса были получены при использовании стандартного карбодиимидного метода химической иммобилизации фермента на электроде (то есть включающего промежуточную отмывку поверхности электрода от сшивающих агентов): $E_{1/2}$ для Fe^{3+}/Fe^{2+} около -72 мВ по отношению к СВЭ и $\Delta E_p = 195$ мВ при скорости развёртки 100 В/с. При этом второй переход был плохо различим на фоне перехода Fe^{3+}/Fe^{2+} . Применение же модифицированного протокола химической иммобилизации γ TOP (при одновременном нанесении фермента и карбодиимида на поверхность электрода) привело к дальнейшему увеличению высоты анодного и катодного пиков, а также к

говорят об увеличении скорости прямого переноса электронов при использовании модифицированного метода химической иммобилизации гТОР (без промежуточной отмывки от EDAC и sulfo-NHS).

Таблица 5

Электрохимические характеристики биосенсоров, полученных с использованием разных методов иммобилизации гТОР на поверхности графитового электрода.

Метод иммобилизации	$E_{1/2}$ (по отн. к СВЭ), мВ	Полуширина пика, мВ	k_s , c^{-1}
Физическая адсорбция	$-(80 \pm 8)$	136 ± 16	300 ± 30
Химическая иммобилизация (с промежуточной отмывкой электрода от сшивающих агентов)	$-(72 \pm 12)$	163 ± 20	280 ± 30
Химическая иммобилизация (с одновременным нанесением фермента и сшивающих агентов на электрод)	$-(100 \pm 10)$	213 ± 15	350 ± 30

Далее были записаны ЦВА в присутствии различных концентраций H_2O_2 . Биосенсор, полученный с помощью физической адсорбции гТОР на поверхности электрода, имел самый низкий отклик на H_2O_2 . Применение химической иммобилизации гТОР привело к значительному увеличению регистрируемого тока. Однако форма ЦВА в присутствии H_2O_2 существенно различалась при использовании стандартного и модифицированного карбодиимидного метода химической иммобилизации фермента на электроде: в первом случае ЦВА имели S-образную форму, что говорит о кинетических ограничениях процесса, а при химической иммобилизации гТОР без отмывки электрода от EDAC и sulfo-NHS ЦВА имели больший наклон и чётко выраженный анодный пик, что говорит о лимитирующей стадии диффузии H_2O_2 к поверхности электрода. Данный эффект может быть связан с большей поверхностной концентрацией активного фермента при втором варианте химической иммобилизации гТОР.

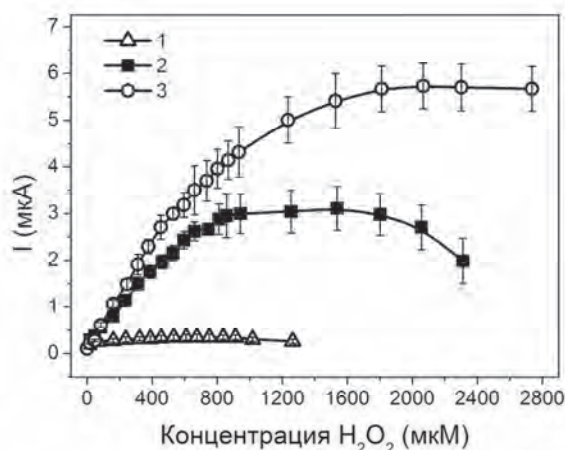


Рис. 17. Электрокаталитический ток при внесении 0,56 мМ H_2O_2 и постоянном приложенном потенциале 0,3 В для трёх различных методов иммобилизации гТОР на поверхности электрода: **1** – физическая адсорбция; **2** – химическая иммобилизация с использованием карбодиимидного метода с промежуточной отмывкой электрода от EDAC и sulfo-NHS; **3** – химическая иммобилизация с использованием карбодиимидного метода без промежуточной отмывки электрода от EDAC и sulfo-NHS.

Для исследуемых биосенсоров были построены кривые зависимости тока от концентрации H_2O_2 (рис. 17). Если при физической адсорбции фермента ток достигал максимального значения уже при концентрации H_2O_2 около 0,1 мМ, при химической иммобилизации гТОР наблюдался существенно более высокий отклик на H_2O_2 и широкий линейный диапазон на калибровочной кривой. При этом стабильность фермента к инактивации H_2O_2 существенно различалась при применении стандартного и модифицированного карбодиимидного метода иммобилизации: в первом случае ток достигал максимального значения примерно при 0,8 мМ H_2O_2 , во втором – при 1,8 мМ H_2O_2 . Сравнение характеристик безреагентных

биосенсоров на основе гТОР, полученных с использованием двух методов химической иммобилизации, приведены в таблице 6. Видно, что одновременное нанесение фермента и сшивающих агентов позволило получить биосенсор с большей чувствительностью определения H_2O_2 , а также более широким линейным диапазоном.

Таблица 6

Параметры безреагентных биосенсоров, полученных с использованием химической иммобилизации гТОР на поверхности графитового электрода.

Метод иммобилизации	Предел обнаружения H_2O_2 , мкМ	Чувствительность, $mA/(M \cdot cm^2)$	Линейный диапазон, мкМ
Химическая иммобилизация (с промежуточной отмывкой электрода от сшивающих агентов)	$3 \pm 0,2$	55 ± 5	10 - 700
Химическая иммобилизация (с одновременным нанесением фермента и сшивающих агентов на электрод)	$2 \pm 0,2$	80 ± 4	10 - 900

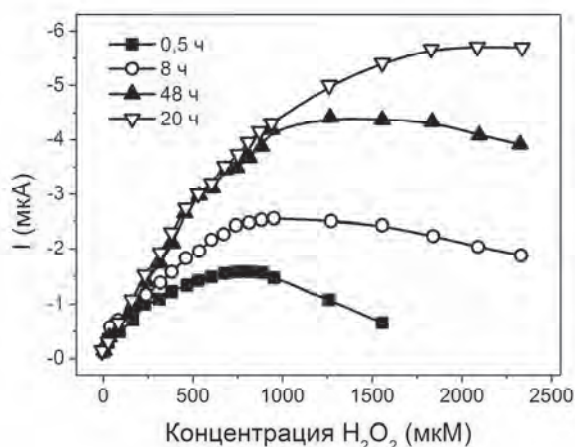


Рис. 18. Зависимость электрокаталитического тока от концентрации H_2O_2 при постоянном приложенном потенциале 0,3 В при различной продолжительности инкубации гТОР с EDAC и sulfo-NHS на поверхности электрода.

образование межмолекулярных ковалентных сшивок. Для проверки данного предположения было изучено влияние времени совместной инкубации гТОР и сшивающих агентов на свойства биосенсора. Показано, что оптимальной является 20-часовая инкубация, так как при дальнейшем увеличении продолжительности иммобилизации происходит снижение регистрируемого тока при высоких концентрациях H_2O_2 (рис. 18). Было изучено также влияние времени совместной инкубации гТОР, EDAC и sulfo-NHS на значения поверхностной концентрации электроактивных групп Γ_{gem} и константы скорости прямого переноса электронов k_s . Из рис. 19 видно, что несмотря на возрастание Γ_{gem} с увеличением времени инкубации (с 70 пмоль/ cm^2 при 10-часовой инкубации до 130 пмоль/ cm^2 при 50-часовой инкубации), значение k_s сильно снижается уже примерно через сутки после нанесения фермента на поверхность электрода (с 350 s^{-1} при 10-часовой инкубации до 150 s^{-1} при 50-часовой инкубации). Это, по-видимому, и обуславливает снижение отклика биосенсора при большей продолжительности иммобилизации фермента. Вероятно, длительная инкубация (более 20 ч) гТОР с sulfo-NHS и EDAC приводит к значительным конформационным изменениям в структуре

Так как при физической адсорбции гТОР на электроде и её химической иммобилизации константы скорости прямого переноса электронов k_s имели сходные значения (табл. 5), низкий отклик биосенсора на основе гТОР на H_2O_2 в случае физической адсорбции говорит, по-видимому, о значительных конформационных изменениях в структуре активного центра фермента. Причиной же высокой операционной стабильности, достигнутой при одновременной инкубации гТОР, EDAC и sulfo-NHS на поверхности электрода, может являться

фермента из-за образования внутри- и межмолекулярных сшивок и падению его каталитической активности и стабильности.

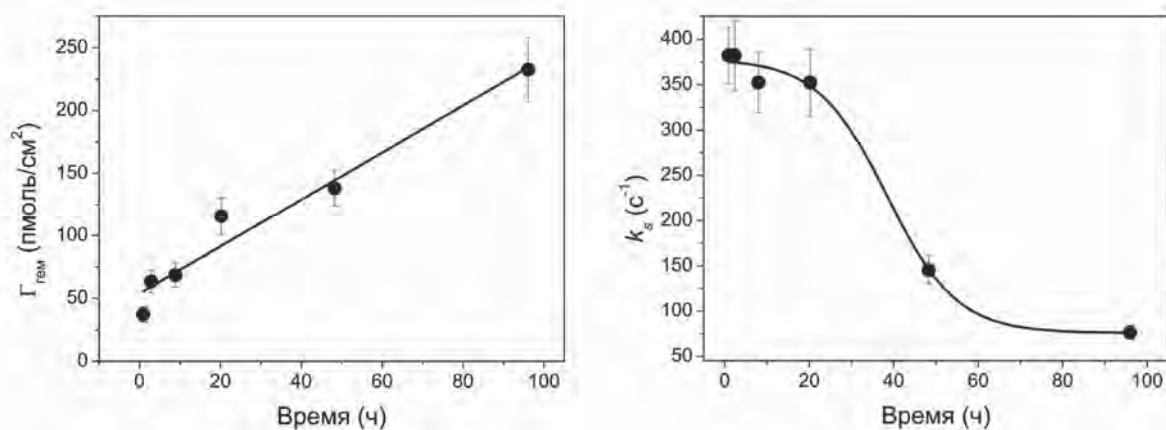


Рис. 19. Зависимость поверхностной концентрации электроактивных групп (слева) и константы скорости прямого переноса электронов (справа) от продолжительности инкубации гТОР с EDAC и sulfo-NHS на поверхности электрода.

Таким образом, было показано, что способ иммобилизации гТОР на электроде оказывает огромное влияние как на электрокаталитические свойства иммобилизованного фермента, так и на характеристики безмедиаторного биосенсора на его основе. В целом, химическая иммобилизация гТОР на поверхности графитового электрода даёт лучшие результаты по сравнению с физической адсорбцией фермента. При этом изменение протокола химической иммобилизации со стандартного карбодиимидного метода, включающего отмывку активированного электрода от избытка сшивающих агентов, на протокол с одновременным внесением растворов фермента и карбодиимида приводит к существенному увеличению линейного диапазона определения H_2O_2 , а также повышению операционной стабильности безмедиаторного биосенсора на основе гТОР.

ВЫВОДЫ

1. Оптимизированы условия рефолдинга рекомбинантной пероксидазы табака (гТОР) из телец включения методом разведения. В результате эффективность рефолдинга гТОР при оптимизированных условиях по сравнению с ранее достигнутыми величинами увеличилась более, чем в 6 раз и составила около 85 %. Данная эффективность является одной из самых высоких для рефолдинга рекомбинантных белков из телец включения. Выход активной гТОР после двухстадийной очистки составил около 56 мг с 1 л культуральной среды.
2. Проведено сравнение эффективности рефолдинга гТОР при использовании метода разведения и гель-фильтрационной хроматографии. Показано, что в случае последнего метода выход по активности в 3 раза ниже по сравнению с оптимизированным методом разведения.
3. Изучено влияние ионов кальция на стабильность и каталитические свойства гТОР. Показано, что в присутствии ионов кальция рН-оптимум активности фермента не меняется, однако активность гТОР по отношению ко всем изученным ароматическим электрон-донорным субстратам (фенолу, гваяколу, АБТС и люминолу) при инкубации в среде, содержащей ионы кальция, снижается (на 20-40 % при инкубации с 20 мМ Ca^{2+}). В то же время внесение ионов кальция повышает стабильность гТОР к

термоинактивации (константа скорости термоинактивации гТОР при 52 °С ниже в 2 раза в присутствии 5 мМ Ca²⁺).

4. Получены конъюгаты гТОР и её мутантной формы гТОР-F140Y с антителами козы против IgG мыши. Синтезированные конъюгаты использованы для определения концентрации модельного объекта – IgG мыши – методом иммуноферментного анализа. Показано, что применение гТОР и мутантной формы гТОР-F140Y в качестве ферментной метки позволяет повысить интенсивность сигнала при колориметрической детекции по сравнению с коммерческим конъюгатом антител с пероксидазой из корней хрена (HRP) (в 3 и 2 раза, соответственно). При этом в случае гТОР-IgG чувствительность анализа выше по сравнению с HRP-IgG во всем изученном диапазоне концентраций IgG мыши (при низких концентрациях – в 2 раза, при высоких – в 3 раза), а в случае гТОР-F140Y-IgG – в области высоких концентраций (в 3 раза). При детекции ферментной метки по хемилюминесценции интенсивность сигнала при использовании конъюгатов антител с гТОР и гТОР-F140Y по сравнению с HRP выше в 110 и 20 раз, соответственно. Также при детекции по хемилюминесценции гТОР-IgG и гТОР-F140Y-IgG обеспечивают более высокую чувствительность анализа по сравнению с HRP-IgG: в области низких концентраций аналита - в 49 и 11 раз, соответственно; в области высоких концентраций – в 54 и 23 раза, соответственно.
5. Изучено влияние способа иммобилизации гТОР на характеристики безмедиаторного биосенсора для определения концентрации пероксида водорода. Выявлено, что химическая иммобилизация гТОР на поверхности графитового электрода с использованием карбодиимидного метода по сравнению с физической адсорбцией фермента приводит к улучшению характеристик биосенсора: чувствительности – с 11 мА·М⁻¹·см⁻² при физической адсорбции до 55 мА·М⁻¹·см⁻² при химической иммобилизации с последовательным нанесением сшивающих агентов (EDAC и sulfo-NHS) и фермента и 80 мА·М⁻¹·см⁻² при химической иммобилизации с одновременным нанесением гТОР, EDAC и sulfo-NHS; линейного диапазона - с 10-80 мкМ H₂O₂ до 10-700 и 10-900 мкМ H₂O₂, соответственно. Показано, что ключевую роль в стабилизации гТОР при иммобилизации фермента путём совместной инкубации со сшивающими агентами играет образование внутри- и межмолекулярных ковалентных сшивок.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Zakharova G.S.**, Poloznikov A.A., Chubar T.A., Gazaryan I.G., Tishkov V.I. High-yield reactivation of anionic tobacco peroxidase overexpressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2015, V.113, no.1, pp.85–93.
2. Poloznikov A.A., **Zakharova G.S.**, Chubar T.A., Tishkov V.I., Gazaryan I.G. Site-directed mutagenesis of tobacco anionic peroxidase: effect of additional aromatic acids on stability and activity. *Biochimie*, 2015, V.115, no.1, pp.71–77.
3. **Zakharova G.S.**, Uporov I.V., Tishkov V.I. Horseradish peroxidase: Modulation of properties by chemical modification of protein and heme. *Biochemistry (Moscow)*, 2011, V.76, no.13, pp.1391-1401.

4. **Zakharova G.S.**, Poloznikov A.A., Tishkov V.I. Effect of calcium ions on activity and thermal stability of recombinant anionic tobacco peroxidase. *Abstracts of International Conference "Biocatalysis 2015: Fundamentals and Applications"*, June 21-26, 2015, Moscow region, Russia, p.51.
5. Tishkov V.I., Alekseeva A.A., Zarubina S.A., Dolina I.A., Atroshenko D.L., Stepashkina A.V., Poloznikov A.A., **Zakharova G.S.**, Chubar T.A., Gazaryan I.G., Fedorchuk V.V., Sklyarenko A.V., Yarotsky S.V., Savin S.S. Protein engineering. New paradigm for creation of biocatalysts. *Abstracts of International Conference "Biocatalysis 2015: Fundamentals and Applications"*, June 21-26, 2015, Moscow region, Russia, p.31.
6. Тишков В.И., Алексеева А.А., Голубев И.В., Федорчук В.В., Каргов И.С., Зарубина С.А., Долина И.А., Атрошенко Д.Л., **Захарова Г.С.**, Полозников А.А., Виролайнен Т.С., Ковалевский Р.П., Степашкина А.В., Чубарь Т.А., Упоров И.В., Скляренко А.В., Яроцкий С.В., Савин С.С. Рациональный дизайн ферментов для биотехнологии. VIII Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы». Москва, Россия, 17-20 марта 2015г. Материалы конгресса, часть 2, с. 452-453.
7. **Захарова Г.С.**, Газарян И.Г., Полозников А.А., Чубарь Т.А., Тишков В.И. Peroxidase of tobacco – highly effective biocatalyst for analytical biotechnology and fine organic synthesis. *Тезисы XIV Международной конференции молодых учёных «Леса Евразии – Вологодские зори»*, 29 сентября – 5 октября 2015, Вологда, Россия, с.52-54.
8. **Zakharova G.S.**, Poloznikov A.A., Tishkov V.I. Anionic tobacco peroxidase as enzyme label in chemiluminescent immunoassay. *Book of Abstracts of the International BioForum 2014*, Russian-German Session, April 22-24, 2014, Pushchino, Russia, p.41-42.
9. **Zakharova G.S.**, Poloznikov A.A., Chubar T.A., Tishkov V.I. Optimization of refolding conditions for recombinant anionic tobacco peroxidase overexpressed in *E. coli*. *Books of Abstracts of the 10th International Conference on Protein Stabilization "ProtStab2014"*, May 7-9, 2014 Stresa, Italy, p.65.
10. Tishkov V.I., **Zakharova G.S.**, Gazaryan I.G., Hushpulian D.M., Poloznikov A.A. Optimization of the refolding yield of recombinant anionic tobacco peroxidase. *Program and Book of Abstracts of International Conference OxiZymes-2014*, July 1-4, 2014, Vienna, Austria, P2, p.162.
11. **Zakharova G.S.**, Hushpulian D.M., Tishkov V.I. Recombinant anionic tobacco peroxidase as enzyme label in chemiluminescence immunoassay. *Abstracts of the 21th International Conference INPEC-2014*, September 10-14, 2014, Zelenogorsk, St.Petersburg region, Russian Federation, pp.39-40.
12. Tishkov V.I., Alekseeva A.A., Zarubina S.A., Kargov I.S., Stepashkina A.V., Fedorchuk V.V., Fedorchuk E.A., **Zakharova G.S.**, Uporov I.V., Komarova N.V., Poloznikov A.A., Savin S.S. "Protein engineering of enzymes for fine organic synthesis, pharmaceutical industry and medicine diagnostics" Proceedings of the VII Moscow International Congress "Biotechnology: State of the Art and Prospects of Development", March 19-22, 2013. Moscow: JSC "Expo-biochem-technologies" D.I.Mendeleev University of Chemistry and Technology of Russia, ISSN 5-7237-0372-2, 2013, part II, p. 140.