

УДК 577.152.1

ПОВЫШЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ ЛЮЦИФЕРАЗЫ СВЕТЛЯКОВ *Luciola mingrelica* СЛУЧАЙНЫМ МУТАГЕНЕЗОМ

М.И. Кокшаров, Н.Н. Угарова

(кафедра химической энзимологии; e-mail: mkoksharov@enz.chem.msu.ru)

Люцифераза светляков находит широкое применение в ряде областей биотехнологии и молекулярной биологии, но использование люциферазы часто ограничивается ее быстрой инактивацией при повышенных температурах. В результате четырех последовательных циклов случайного мутагенеза мы получили мутант люциферазы светляков *Luciola mingrelica* со значительно возросшей термостабильностью. Полученные аминокислотные замены также привели к повышению удельной активности и снижению константы Михаэлиса по АТР в 8 раз, что свидетельствует о более высокой каталитической эффективности мутанта. Показано, что использование случайного мутагенеза является высокоэффективным подходом для увеличения стабильности люциферазы.

Ключевые слова: люцифераза светляков, *Luciola mingrelica*, случайный мутагенез, термостабильность, спектры биоломинесценции.

Люцифераза светляков (КФ 1.13.12.7) катализирует реакцию окисления D-люциферина (LH₂) кислородом воздуха в присутствии АТР и ионов Mg²⁺ [1]. Она является одним из самых эффективных преобразователей энергии химической реакции в свет [2, 3]. Благодаря высокой каталитической активности, специфичности к АТР и простоте регистрации биоломинесцентного сигнала люцифераза светляков широко применяется в различных аналитических методах, основанных на определении АТР [4], используется в качестве гена-маркера [5], в пиросеквенировании и ряде других областей. Применение нативных люцифераз светляков часто ограничивается их низкой стабильностью при повышенных температурах. В частности, люцифераза светляков *Luciola mingrelica* дикого типа при 37° теряет половину активности за 50 мин.

Проводилось множество работ по увеличению термостабильности люцифераз светляков с помощью случайного и сайт-специфического мутагенеза [6, 7]. Наиболее эффективным оказался метод направленной эволюции – улучшение требуемой характеристики фермента с помощью множества последовательных циклов случайного мутагенеза. Для люциферазы *P. pennsylvanica* таким способом был получен мутант, который даже при 65° лишь незначительно инактивировался за 5 ч [8]. Авторы применяли весьма сложную многостадийную схему отбора мутантов. Но простота регистрации биоломинесценции люциферазы *in vivo* и способность клеток

E. coli выдерживать повышенные температуры в принципе позволяют проводить простой нелетальный скрининг колоний клеток по термостабильности экспрессируемого фермента.

Цель данной работы состояла в изучении возможности повышения термостабильности люциферазы светляков с помощью случайного мутагенеза с последующим скринингом *in vivo*.

Материалы и методы

Использованные вещества и растворы. Использовали аденозин-5'-трифосфат (АТР), дитиотреитол (ДТТ), бычий сывороточный альбумин (БСА) (“Sigma”, США), D-люциферин, полученный по методу [9], олигонуклеотиды (“Синтол”, Россия). Для проведения реакции мутагенеза и клонирования требуемых фрагментов ДНК использовали ферменты TaqSE ДНК-полимеразу фага (“СибЭнзим”, Россия), Taq ДНК-полимеразу, T4 ДНК-лигазу (“Силекс”, Россия) и ряд рестриктаз фирм “СибЭнзим” (Россия), “Fermentas” (Литва) и “Boehringer Mannheim” (Германия). Для выделения плазмид из клеток *E. coli* и элюции фрагментов ДНК из агарозного геля использовали наборы фирмы “Qiagen” (Германия).

Случайный мутагенез участка гена между сайтами рестрикции XhoI и BglII (785 пар оснований) проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) пониженной точности (error prone PCR) [10]. В качестве прямого и обратного праймеров использовали соответственно

5'-GTATTCAGCTCGAGAAAAGGCTTACC-3' и
5'-GCTTGTGGTTTCTTAAGAATTTCTSTAATTAC-3'.

Реакционная смесь (50 мкл) содержала 10 мМ Трис-НСI (рН 8,3 при 25°C), 50 мМ КСI, 7 мМ MgCl₂, 0,2 мМ MnCl₂, 0,2 мМ dATP, 0,2 мМ dGTP, 1 мМ dCTP, 1 мМ dTTP, 20 пмоль каждого праймера, ~2 фмоль плазмиды pLR3 [11] (содержащей ген люциферазы светляков *Luciola mingrelica*), 2,5 ед. Таq ДНК-полимеразы. ПЦР проводили на амплификаторе “Терцик” (“ДНК-технология”, Россия) при следующих условиях: 1 мин при 95°C, затем 25 циклов, каждый из которых включал 1 мин при 94°C, 1,3 мин при 53°C и 1 мин при 72°C; после этого инкубировали еще 10 мин при 72°C. Продукт ПЦР очищали с помощью электрофореза в 1%-й агарозе с последующим выделением из геля. Затем полученный фрагмент обрабатывали рестриктазами XhoI и BglII, очищали от низкомолекулярных продуктов рестрикции с помощью электрофореза, выделяли из геля и лигировали в расщепленную по этим же сайтам плазмиду pLR3. Штамм *E. coli* XL1blue трансформировали полученной лигазной смесью, и клетки рассеивали на чашки Петри со средой LB, содержащей 0,1 мг/мл ампициллина. При случайном мутагенезе желательнее, чтобы на мутируемом участке в среднем была замена одной аминокислоты (2–3 замены нуклеотидов) [10], что обычно соответствует 50–60% активных клонов [12] в получаемой библиотеке. В данном методе частоту мутагенеза контролировали концентрацией Mn²⁺, и при выбранных условиях наблюдалось 55–70% активных мутантов люциферазы.

Скрининг библиотеки мутантов по термостабильности проводили, инкубируя чашки с колониями трансформированных клеток в течение 40 мин при повышенной температуре (37–55°C), что приводило к инактивации *in vivo* недостаточно стабильных форм люциферазы. Затем проводили фотографическую регистрацию биолюминесценции колоний *in vivo*, как описано в [11]. Оптимальным был скрининг рассева не более 2 тысяч колоний на чашке Петри (90 мм). Колонии, сохранявшие заметно более высокую яркость по сравнению с основной массой, переносили на чашки Петри со средой LB, содержащей 0,1 мг/мл ампициллина. Для сравнения на эти же чашки переносили несколько колоний варианта люциферазы, ген которого использовали в качестве матрицы в текущем цикле мутагенеза. Клетки выращивали в течение ночи при 37°C. Проводили регистрацию биолюминесценции *in vivo*: для одной реплики – после вы-

ращивания клеток, для другой – после инкубации при повышенной температуре в течение 40 мин.

Получение вектора для экспрессии люциферазы. Для наработки и очистки люциферазы сконструировали вектор pETL7. Сначала с помощью ПЦР с обратным мутагенным праймером

5'-GTGGTTCGACTGGGCCCGATGTGGTTTCTTAAGAATTTCS-3'

получили фрагмент гена люциферазы, в котором были изменены три последние аминокислоты, после которых без разрыва рамки считывания добавлен сайт рестрикции SalI. Рестрикцией продукта ПЦР получили фрагмент BamHI-SalI. Рестрикцией плазмиды pLR3 получили фрагмент NheI-BamHI. После очистки оба фрагмента лигировали в вектор pET23b (“Novagen”, США), разрезанный по сайтам NheI и XhoI. Липкие концы сайтов SalI и XhoI совместимы, и после лигирования оба сайта исчезают. Полученная в результате плаزمиды pETL7 содержала ген люциферазы, в котором по сравнению с нативным ферментом с N-конца добавлена последовательность MASK, а C-концевая последовательность АКМ заменена на последовательность SGPVENNNNNH. C-концевая 6xHis-последовательность позволяет производить очистку люциферазы с помощью металло-хелатной хроматографии. Кроме того, в концевом участке, кодирующем последовательность SGP, был добавлен новый сайт рестрикции ApaI, что позволяет клонировать в эту плазмиду концевую часть гена люциферазы.

Высокоочищенный фермент дикого типа и мутант получали на основе вектора pETL7. Ген мутанта для этого предварительно переклонировали из pLR3 в pETL7. Фермент экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus, выделяли и очищали по методике, описанной в [11]. Концентрацию люциферазы определяли по оптической плотности раствора при 280 нм (0,75 ед. оптической плотности соответствует раствору, содержащему 1 мг/мл люциферазы).

Активность люциферазы определяли по величине максимальной интенсивности биолюминесценции при насыщающих концентрациях субстратов (1 мМ АТФ и 0,3 мМ LH₂) на люминометре FB 12 (“Zylux”, США) [11]. Константы Михаэлиса для люциферина и АТФ определяли, варьируя концентрации субстратов в пределах, соответствующих 0,4–7 величин K_m . Расчет K_m проводили с помощью программы *Origin 7.5* по методу нелинейной регрессии с использованием уравнения Михаэлиса–Ментен.

Изучение необратимой термоинактивации люциферазы. Готовили раствор фермента (0,01 мг/мл) в охлажденном в снегу буферном растворе ТВ1 (50 мМ трис-ацетат, pH 7,8, 20 мМ MgSO₄, 2 мМ ЭДТА, 0,2 мг/мл БСА), если не оговорено иное. В ряде экспериментов использовали буфер ТВ2 (50 мМ Na-фосфат, pH 7,8, 410 мМ (NH₄)₂SO₄, 2 мМ ЭДТА, 0,2 мг/мл БСА). В случае сравнительно медленной инактивации, когда период полуинактивации был более часа, инкубировали 1,0–1,5 мл раствора фермента в твердотельном термостате “Гном” (“ДНК-технология”, Россия) при заданной температуре. В случае быстрой термоинактивации предварительно разливали по 50 мкл раствора фермента в 7–8 тонкостенных микропробирок (0,5 мл), а затем инкубировали в водяном термостате. Через определенные промежутки времени отбирали пробы по 50 мкл, инкубировали в снегу не менее 15 мин, а затем определяли активность фермента.

Спектры биолюминесценции регистрировали на люминесцентном спектрометре LS 50B (“Perkin-Elmer”, США) в режиме “биолюминесценция” при ширине щели 10 нм в соответствии с условиями, описанными в [11].

Результаты и их обсуждение

Случайный мутагенез и отбор термостабильных мутантов. Так как для идентификации термостабильных мутантов использовали процедуру скрининга, не требовавшую разрушения клеток колоний *E. coli*, то это избавляло от необходимости получать реплики колоний, что заметно упрощало и ускоряло процесс отбора. Используемая схема ограничена способностью клеток *E. coli* выживать при повышенной температуре за время инкубации. Начиная с ~60°C клетки гибнут в течение 1–2 мин, т.е. при более высокой температуре использование реплик необходимо. Случайный мутагенез проводили на участке гена, кодирующем 130–391 из 548 аминокислотных остатков люциферазы. Провели четыре последовательных цикла мутагенеза, в каждом последующем цикле в качестве матрицы использовали наиболее стабильный мутант из предыдущего цикла. В качестве исходной формы для мутагенеза был взят мутант S118C [11], немного более стабильный, чем исходная люцифераза. В ходе первого цикла был проведен скрининг ~800 колоний после роста при 37°C и обнаружено три клона с повышенной яркостью. Во втором, третьем и четвертом циклах условия и результаты были следующие: температура инкубации перед скринингом 50,

50 и 55°C; примерное число колоний 900, 580 и 1400; число найденных термостабильных мутантов 3, 3, 1 соответственно. Мутант 4TS, полученный после четвертого цикла мутагенеза, превосходил по стабильности *in vivo* все предыдущие мутанты: свечение его колоний сохранялось после 80 мин инкубации при 55°C, в то время как другие мутанты полностью инактивировались.

Секвенирование полученных мутантов показало, что мутант 4TS содержит 7 новых замен: после первого цикла мутагенеза появились замены Thr213Ser, Ser364Cys; после второго – Lys156Arg, Ala217Val; после третьего – Cys146Ser, Glu356Lys; после четвертого – Arg211Leu. Судя по порядку добавления замен, литературным данным и расположению остатков в структуре фермента, за увеличение термостабильности преимущественно ответственны только 4 замены: Arg211Leu, Ala217Val, Glu356Lys и Ser364Cys. Для мутаций Ala217Val [13] и Glu356Lys [6, 14] известно, что они значительно увеличивают термостабильность люцифераз светляков. Мутации Ser364Cys и Arg211Leu увеличивают термостабильность, по-видимому, за счет замены погруженной в белковую глобулу полярной группы на гидрофобную. Остаток Lys156 находится на поверхности белковой глобулы и окружен молекулами воды, поэтому его замена на близкий по свойствам Arg не должна существенно влиять на стабильность фермента. Замена внутреннего остатка Thr213 на близкий по свойствам Ser также, по-видимому, не является стабилизирующей. Ранее было показано [15], что замена поверхностной группы Cys146Ser заметно уменьшает окислительную инактивацию, что увеличивает стабильность фермента при 37°C в 1,5–4,7 раза в зависимости от условий, так что она также может давать вклад в стабилизацию 4TS.

Влияние мутаций на свойства люциферазы. Люцифераза дикого типа (WT) и мутант 4TS были получены в высокоочищенном виде. Их основные каталитические и биолюминесцентные характеристики приведены в таблице.

Показано, что рост термостабильности сопровождается повышением удельной активности мутанта в 1,9 раза. Уменьшение в восемь раз K_m по АТФ для мутанта 4TS свидетельствует о значительно большем сродстве фермента к АТФ. С практической точки зрения это может способствовать более низкому пределу обнаружения АТФ [4]. На рис. 1 приведены спектры биолюминесценции WT и 4TS при разных значениях pH и температуры. При стандартных реакционных условиях (pH 7,8; 25°C) у мутанта заметно

Физико-химические свойства люциферазы светляков *Luciola mingrelica* дикого типа (WT) и мутанта 4TS

Фермент	Удельная активность, %	K_m , мкМ		Максимум спектра биолюминесценции (полуширина), нм		Время полуинактивации при 42°C, мин
		LH ₂	АТФ	pH 7.8	pH 6.0	
WT	100	71±5	330±60	566 (78)	616 (80)	9±0,3
4TS	190	60±5	41±8	573 (92)	609 (91)	592±20

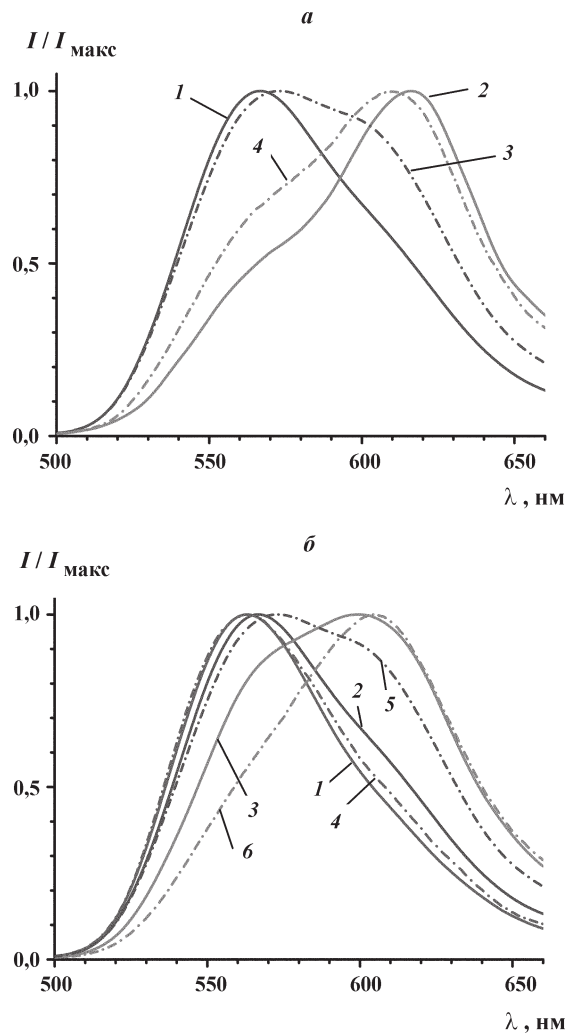


Рис. 1. Спектры биолюминесценции люциферазы дикого типа (WT) и мутанта 4TS: (а) при 25°C, pH 7,8 (1 – WT; 3 – 4TS) и pH 6,0 (2 – WT, 4 – 4TS); (б) при pH 7,8 и температуре 10, 25, 42°C (1, 2, 3 – WT; кривые 4, 5, 6 – 4TS соответственно)

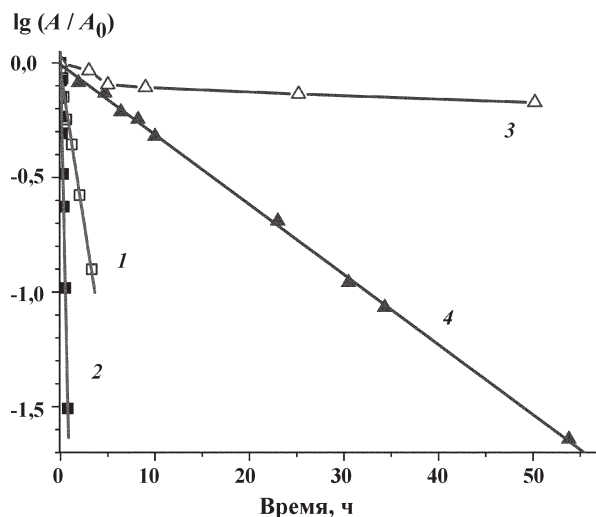


Рис. 2. Кинетические кривые термоинактивации WT (1 и 2) и 4TS (3 и 4) в буферном растворе TB1 при 37°C (1 и 3) и 42°C (2 и 4)

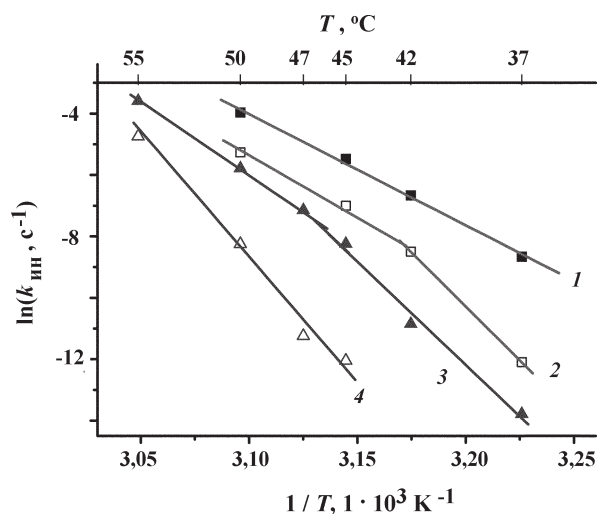


Рис. 3. Зависимость константы скорости термоинактивации от температуры в координатах Аррениуса для WT (1 и 2) и 4TS (3 и 4) в буферных растворах TB1 (1 и 3) и TB2 (2 и 4)

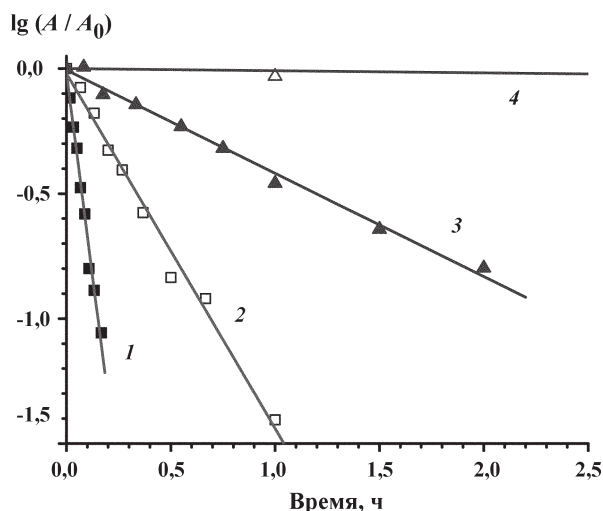


Рис. 4. Кинетические кривые термоинактивации WT (1 и 2) и 4TS (3 и 4) при 45°C в буферных растворах TB1 (1 и 3) и TB2 (2 и 4)

возрастает доля “красного излучателя” в спектре по сравнению с WT (рис. 1, а), что приводит к уширению и смещению максимума спектра биолюминесценции. Интересно, что несмотря на это при понижении pH сдвиг в красную область у мутанта происходит медленнее, чем у WT (рис. 1, а).

Сравнение спектров при температуре 10–42°C (рис. 1, б) показывает, что увеличение красной биолюминесценции у мутанта по сравнению с WT обусловлено более быстрым возрастанием доли этой компоненты спектра при повышении температуры. В работах [7, 14] показано, что повышение термостабильности мутантов часто сопровождается понижением чувствительности спектра к изменению pH и сдвигом максимума биолюминесценции в зеленую область, что объясняется уменьшением конформационной подвижности активного центра. Изучение термостабильного мутанта 4TS показывает, что в общем случае эти свойства независимы.

Кинетика термоинактивации исходной и мутантной люциферазы была изучена при 37–55°C в трис-ацетатном буферном растворе TB1, который близок по составу к буферу, применяемому на практике в АТР-метрии. Для сравнения термоинактивация была изучена в Na-фосфатном буфере TB2, который использовался в ряде работ по мутагенезу [6, 14] и значительно стабилизировал люциферазу.

При всех значениях температуры наблюдается инактивация по первому порядку за исключением 37°C в TB1, где у мутанта наблюдается короткий этап ускоренной (на 20%) инактивации, а затем переход на более медленную стадию (рис. 2). На рис. 3 показана зависимость константы термоинактивации ($k_{ин}$) от температуры в координатах Аррениуса.

Результаты показывают, что мутации привели к значительной стабилизации люциферазы (рис. 2, 3). При 42°C в буферном растворе TB1 мутант стабильнее WT в 65 раз: время полуинактивации ($t_{1/2}$) возрастает с 9 до 592 мин (рис. 2). Как показано на рис. 3, при дальнейшем повышении температуры различие в стабильности постепенно сокращается (до 6 раз при 50°C). Буферный раствор TB2 вызывает существенную стабилизацию как исходной, так и мутантной люциферазы (рис. 3). Степень стабилизации также уменьшается с повышением температуры. В целом можно отметить, что степень стабилизации при конкретной температуре в изучаемом интервале тем выше, чем выше начальная стабильность (рис. 4). Поэтому в растворе TB2 наблюдается и более высокий стабилизирующий эффект мута-

ций, например при 45°C стабильность 4TS в ТВ2 выше стабильности WT в 155 раз ($t_{1/2}$ возрастает с 12,7 до 2000 мин), в то время как стабильность 4TS в ТВ1 выше стабильности WT только в 16 раз ($t_{1/2}$ возрастает с 2,8 до 44 мин) (рис. 4). Обычно люциферазы используются в диапазоне температур от комнатной до 37°C. При этой температуре мутант

4TS через двое суток все еще сохраняет 70% активности, т. е. его стабильность достаточна для большинства практических применений.

Секвенирование ДНК проводили в Межинститутском центре коллективного пользования «ГЕНОМ» ИМБ РАН (<http://www.genome-centre.narod.ru>), организованном при поддержке РФФИ (грант №00-04-55000).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 08-04-00624).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Luca M. // Adv.Enzymol. 1976. **44**. P. 37.
2. Seliger H.H., McElroy W.D. // Arch Biochem Biophys. 1960. **88**. P. 136.
3. Ando Y., Niwa K., Yamada N., Enomoto T., Irie T., Kubota H., Ohmiya Y., Akiyama H. // I. Nature Photon. 2008. **2**. P. 44.
4. Lundin A. // Methods Enzymol. 2000. **305**. P. 346.
5. Viviani V.R., Ohmiya Y. // Photoproteins in Bioanalysis. Weinheim. Wiley-VCH. 2006. P. 49.
6. White P.J., Squirrell D.J., Arnaud P., Lowe C.R., Murray J.A. // Biochem J. 1996. **319**. P. 343.
7. Law G.H., Gandelman O.A., Tisi L.C., Lowe C.R., Murray J.A. // Biochem J. 2006. **397**. P. 307.
8. Hall M.P., Gruber M.G., Hannah R.R., Jennens-Clough M.L., Wood K.V. // Bioluminescence and Chemiluminescence. Perspectives for 21st Century. Chichester, Wiley. 1998. P. 200.
9. Талбаровская И.К., Каткова В.А., Рыжова В.В., Щеголев А.А., Березин И.В. // Авт. св. № 1192324. 1983.
10. Cirino P.C., Mayer K.M., Umeno D. // Methods Mol. Biol. 2003. **231**. P. 3.
11. Кокшаров М.И., Угарова Н.Н. // Биохимия. 2008. **74**. С. 1071.
12. Shafikhani S., Siegel R.A., Ferrari E., Schellenberger V. // Biotechniques. 1997. **23**. P. 304.
13. Kajiyama N., Nakano E. // Biochemistry. 1993. **32**. P. 13795.
14. Kitayama A., Yoshizaki H., Ohmiya Y., Ueda H., Nagamune T. // Photochem Photobiol. 2003. **77**. P. 333.
15. Ломакина Г.Ю., Модестова Ю.А., Угарова Н.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2008. **63**. С. 63.

Поступила в редакцию 25.09.08

THE THERMOSTABILITY ENHANCEMENT OF *Luciola mingrelica* FIREFLY LUCIFERASE BY RANDOM MUTAGENESIS

M.I. Koksharov, N.N. Ugarova

(Division of Chemical Enzymology)

Firefly luciferase has a wide range of applications in a number of areas of biotechnology and molecular biology, but its application is often limited by the rapid inactivation at elevated temperatures. After four consecutive rounds of random mutagenesis we obtained a *Luciola mingrelica* firefly luciferase mutant with significantly increased thermostability. Amino acid substitutions obtained also resulted in an increase of specific activity and lowered a Michaelis constant for ATP 8-fold, which shows higher catalytic efficiency of the mutant. Random mutagenesis was shown to be a highly efficient approach for increasing luciferase stability.

Key words: firefly luciferase, *Luciola mingrelica*, random mutagenesis, thermostability, bioluminescence spectra.

Сведения об авторах: Кокшаров Михаил Иванович – аспирант кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ (mkoksharov@enz.chem.msu.ru); Угарова Наталья Николаевна – главный научный сотрудник кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, доктор химических наук, профессор (nugarova@gmail.com).