

роксидазному превращению, сохраняя в условиях эксперимента около 70–75 % исходной антиоксидантной активности.

Литература

1. The Flavonoids: advances in research / Ed. J.B.Harborne. L.-N.Y, 1988.
2. *Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G.* // Free Radic. Biol. Med. 1996. V.20. P.933–956.
3. *Awad H. M.* // Chem. Res. Toxicol. 2001. V.14. P.398–408.
4. *Сенчук В. В.* Биохимические механизмы окисления фенольных соединений тиреоид-пероксидазой // Достижения современной биологии и биологическое образование. Труды 2 межд.науч.конф. Минск, 2003. С.281–286.
5. *Murakami M.* A comparative study on the various in vitro assays of active oxygen scavenging activity in foods // J. Food Sciences. 2002. V.67, N2. P.539–541.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНОГО ЦИТОХРОМА P450 3A4 ИЗ *ESCHERICHIA COLI*

Е. М. Червяковский

Цитохромы P450 (CYP) относятся к супер-семейству мембраносвязанных, гемсодержащих оксигеназ. Эти ферменты экспрессируются во многих тканях человека и выполняют важные функции, направленные на поддержание гомеостаза организма. Достаточно сказать, что CYP участвуют в биосинтезе стероидных гормонов, желчных кислот, витамина D, а также играют огромную роль в метаболизме чужеродных соединений (ксенобиотиков), в больших количествах поступающих в организм из окружающей среды [1]. В связи с этим особый интерес представляет изучение физико-химических и каталитических свойств отдельных представителей данной группы ферментов. Одним из наиболее важных CYP, экспрессирующихся в организме человека, является цитохром P450 3A4. Это наиболее распространенная изоформа CYP в печени (до 30 % от всех CYP), обладающая широчайшей субстратной специфичностью [2]. Выделение и очистка CYP 3A4 из тканей человека связана с целым рядом проблем и является трудоемкой и сложной процедурой, а конечный выход очищенного фермента как правило не высок. Использование генно-инженерных подходов для гетерологической экспрессии человеческих белков и их аффиной очистки открыло широкие возможности для их получения в значительных количествах. В настоящее время существует несколько систем для гетерологической экспрессии CYP. К ним относятся бактериальные, дрожжевые клетки, а также клетки насекомых и млекопитающих. Преимущества использования бактериальных систем заключаются в большой скорости наработки биомассы и дешевизне исполь-

зуемых культуральных сред по сравнению со средами для культивации клеток насекомых и млекопитающих. Экспрессия СYP в бактериальных клетках в основном заключается в двух подходах: модификация N-концевой части полипептидной цепи фермента [3] или во внедрении последовательности *ompA* в структуру белка, направляющей его в периплазматическое пространство [4].

В данной работе использовался первый из указанных выше подходов. Для экспрессии человеческого СYP 3A4 применялся штамм *E. coli DH5alpha*, трансформированный плазмидой pCW, содержащей под двойным *tac* промотором модифицированный ген 3A4 (рис. 1). Модификация гена 3A4 заключается во введении в него нуклеотидной последовательности, кодирующей шесть остатков гистидина. Клетки указанного штамма культивировались по стандартной методике экспрессии СYP [5]. Бактерии засеивались в 5 мл LB среды, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и выращивались в течение ночи при 37° С при встряхивании на роторном шейкере с интенсивностью 180 об/мин. Аликвоты ночной культуры по 2 мл вносились в 1 л ТВ среды, содержащей 100 мМ фосфатный буфер, pH 7,6, раствор необходимых солей и ампициллин (100 мкг/мл). Клетки выращивались при 37° С при интенсивности встряхивания 180 об/мин до достижения ОП₆₀₀ = 0,4–0,6, после чего в среду добавлялись 1-изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (0,5 мМ), δ-аминолевулиновая кислота (0,5 мМ) и ампициллин (100 мкг/мл). Далее клетки выращивались при 27° С при интенсивности встряхивания 125 об/мин. После 40 часов инкубации клетки собирались при помощи центрифугирования при 3000g в течение 10 мин.

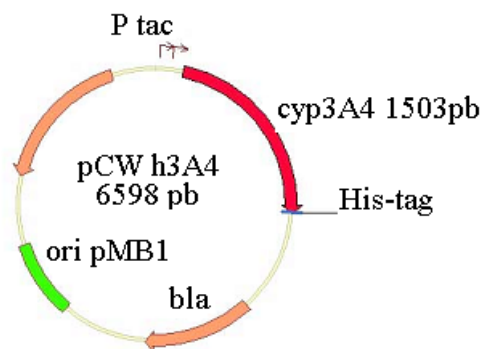


Рис. 1. Экспрессионный вектор pCW для СYP 3A4.

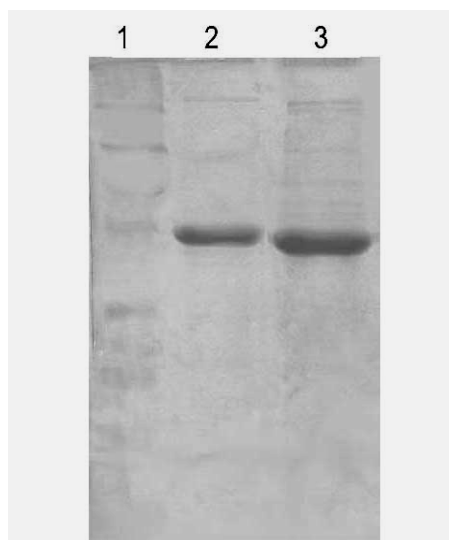


Рис. 2 Электорофореграмма очищенного СYP 3A4: 1 – лестница стандартов BioRad, 2, 3 – препарат СYP после Ni-NTA

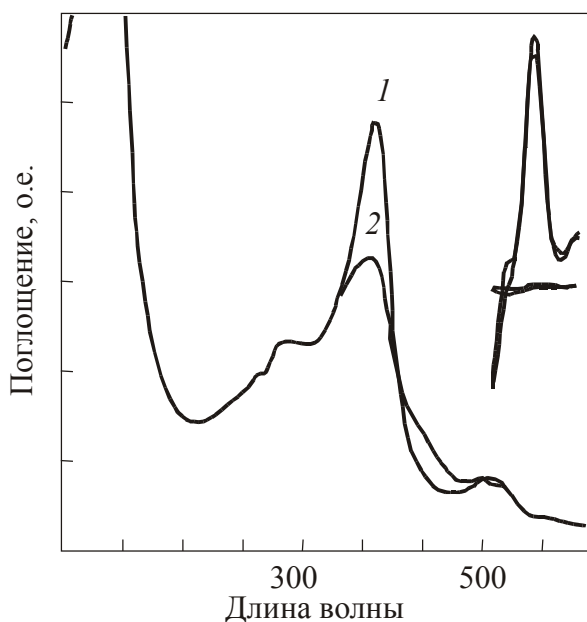


Рис. 3. Спектр поглощения окисленной (1) и восстановленной (2) формы СУР 3А4. На вставке: СО разностный спектр СУР 3А4 с характерным максимумом на 450 нм

Осажденные клетки ре-суспендировались в буфере А (40 мМ Трис-НСl буфер, рН 7,5, содержащий 20 % глицерин и 0,5 мМ PMSF (фенилметансульфонил фторид)). Мембраны получали путем озвучивания суспензии в течение 12 циклов по 30 секунд при максимальной мощности ультразвукового дезинтегратора. На этой стадии выделения СУР 3А4 необходимо следить за тем, что бы температура озвучиваемой суспензии клеток не превышала 20⁰ С, что позволяет избежать денатурации целевого белка. Солюбилизация мембран проводилась на холо-

ду путем добавления по каплям 10 % раствора Emulgen 913 до конечной концентрации 1 %. Суспензия перемешивалась в течение 1,5 часов при 4⁰ С, а затем центрифугировалась при 100000 g в течение 1 часа. Супернатант, содержащий солюбилизованные мембранные белки, отбирался и наносился на Ni-NTA-agarose (QIAGEN) колонку и промывался 10 объемами буфера А, содержащим 50 мМ глицин, 0,3 М NaCl и 0,1 % Emulgen 913. Последующие промывки проводились тем же самым буфером, при ступенчатом повышении концентрации глицина до 60 и 75 мМ. Элюцию белка проводили тем же буфером, в котором вместо глицина присутствовал 50 мМ гистидин. Согласно результатам электрофоретического анализа одной стадии хроматографической очистки препарата СУР 3А4 достаточно для получения гомогенного белка (рис. 2). Очищенный СУР 3А4 подвергался диализу против 20 мМ Трис-НСl буфера, рН 7,5, содержащий 20 % глицерин, 0,1 мМ PMSF и 0,1 мМ DTT. Конечный препарат СУР 3А4 обладал типичными спектральными свойствами, о чем свидетельствуют приведенные спектры поглощения окисленной и восстановленной формы фермента и разностный СО спектр (рис. 3).

Литература

1. Hasler A. J., Estabrook R., Murray M. и др. Human cytochromes P450 // Molecular Aspects of Medicine. 1999. 20, p. 1–137.
2. Shimada T., Martin M. V., Pruess-Schwartz D. и др. Roles of individual human cytochrome P-450 enzymes in the bioactivation of benzo(a)pyrene, 7,8-dihydroxy-7,8-

- dihydrobenzo(a)pyrene, and other dihydrodiol derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons // *Cancer Res.* 1989. 49, p. 6304–6312.
3. *Barnes H. J., Arlotto M. P., and Waterman M. R.* Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17(alpha)-hydroxylase in *Escherichia coli* // *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991. 88, p. 5597–5601.
 4. *Pitchard M. P., Glancey M. J., Blake J. A. R. u òp.* Functional expression of CYP2D6 and himan NADPH-cytochrome P450 reductase in *Escherichia coli* // *Pharmacogenetics.* 1998. 8, p. 33–42.
 5. *Guryev O. L., Gilep A. A., Usanov S. A. u òp.* Interaction of apo-cytochrome b₅ with cytochromes P4503A4 and P45017A: relevance for heme Transfer Reactions // *Biochemistry.* 2001. 40, № 16, p. 5018–5031.