

РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНОЙ МЕТКИ К PIP3

**Силинг Е.А.¹, Глухова А.А.², Мартьянов А.А.^{2,3}, Пантелеев М.А.^{2,3},
Свешникова А.Н.^{2,3}**

¹*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

²*Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия*

³*Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии,
онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва, Россия*

Введение. Фосфатидилинозитол-3-4-5-фосфат (PIP3) – фосфолипид внутреннего слоя мембран клеток эукариот, участвующий в процессах внутриклеточной сигнализации: пролиферации, аутофагии, изменении цитоскелета клеток, везикулярном транспорте. Регуляция происходит посредством прямого взаимодействия с мембранными белками, или с помощью мембранного рекрутирования цитозольных белков, имеющих специфичные домены (домены гомологии плекстрина – PH). [1] Вариабельность аминокислотного состава PH-домена связывают с функциональной эволюцией белков, его содержащих. Существующие метки к PIP3 обладают рядом недостатков: низкой аффинностью, дороговизной и сложностью подготовки препарата.

Методы. AQUA клонирование последовательности PH-домена белка GRP1 в плазмиду pET28a, содержащую кодирующую последовательность белка eGFP. При клонировании использовали штамм XL E.coli. Моделирование плазмиды и дизайн праймеров были выполнены на платформе benchling.com. Экспрессию рекомбинантного белка PH(GRP1)-EGFP осуществляли в штамме BL 21 DE3 E.coli, очистку белка производили на Ni-NTA колонке. Затем проводили диализ очищенного белка против PBSx1. Характеристику спектров поглощения и флуоресценции проводили при помощи спектрофотометрии и флуориметрии.

Результаты. Была получена плазида, содержащая последовательность химерного белка, состоящего из PH-домена GRP1 и eGFP. Плазида была амплифицирована в XL E.coli и очищена с помощью Miniprep. Экспрессия белка проводилась в штамме BL 21 DE3 E.coli. Белок был выделен, очищен на никелевой колонке и переведен в буфер PBS. Посредством флуориметрии и спектрофотометрии белок был проверен на соответствие спектру GFP.

Заключение. Была отработана методика получения рекомбинантных меток H(GRP1)-EGFP. В результате отработки получен белок, потенциально способный селективно связываться с PIP3, дифференцируя его от других фосфоинозитидов. Для подтверждения этого результата, необходимы дальнейшие эксперименты. Вес метки – 46 кДа.

Финансирование. Работа поддержана грантами РФФИ 17-00-00138 и 18-34-20026.

Библиографические ссылки

1. Mark A. Lemmon. Pleckstrin Homology (PH) domains and phosphoinositides // Biochem Soc Symp. 2007. Vol. 74. P. 81-93.