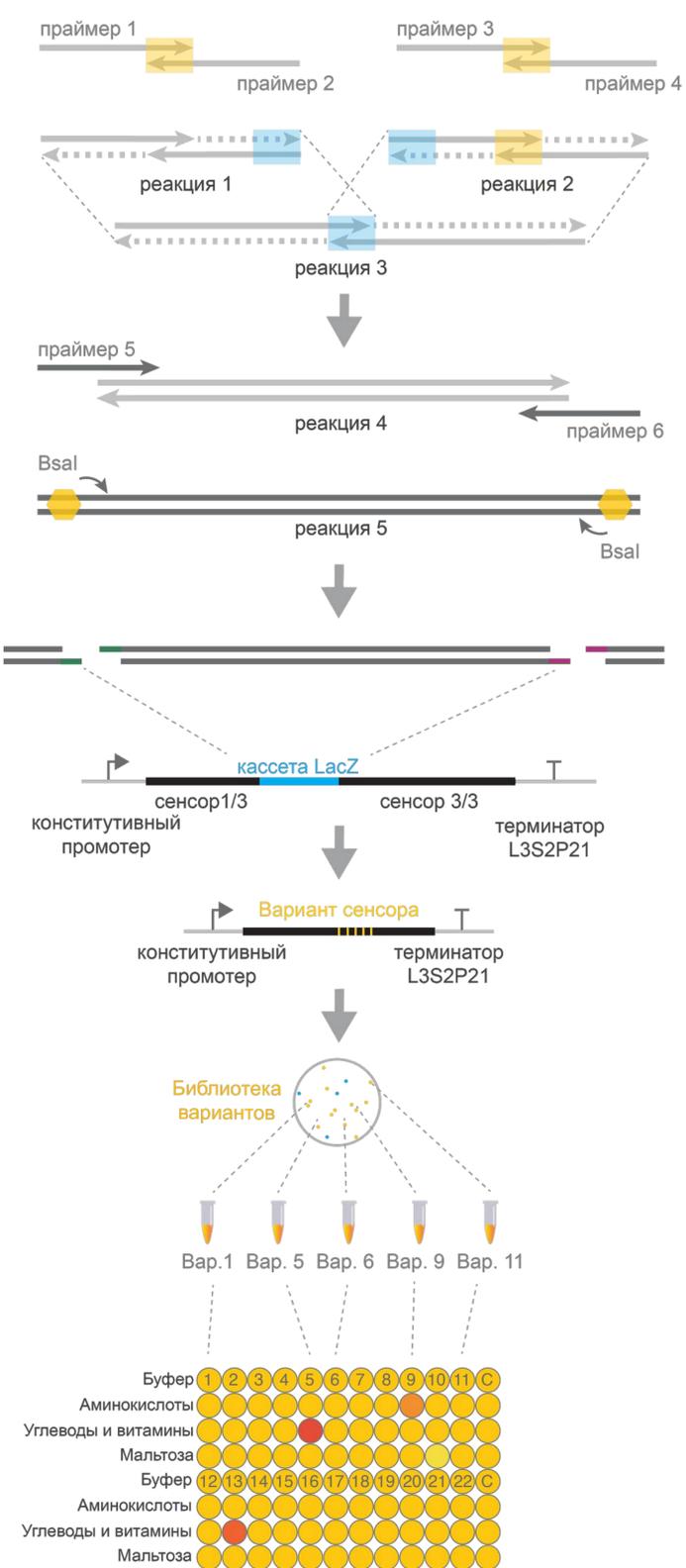


Как создать флуоресцентный сенсор?

Роман Бурлуцкий, Ольга Сулова, Данила Третьяков, Вера Туртапкина, София Хижнякова, Никита Шелудяков, Мария Анастасина, Софья Беляева, Лилия Фахранурова, Анна Пузырёва, Любовь Шестакова, Карен Саркисян

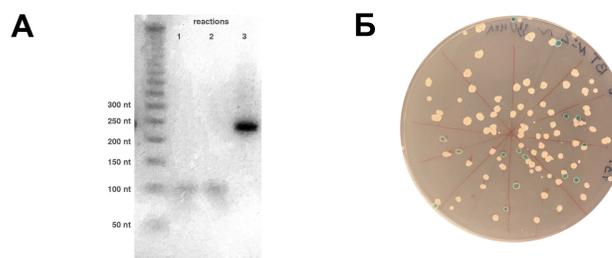


Флуоресцентные сенсоры — это белки, которые светятся, когда связывают какое-нибудь специфическое для них вещество. Такие сенсоры сложно создать, но они позволяют детектировать химические соединения *in vitro* и *in vivo* и поэтому являются важными инструментами в молекулярной биологии. Нашей задачей было “перенастроить” мальтозный сенсор, сделав его чувствительным к другим субстратам.



Структура и принцип работы мальтозного сенсора

Мы выбрали пять аминокислотных позиций в сайте связывания мальтозы (E111, E153, R154, Y155, F156), чтобы заменить их на случайные аминокислоты и протестировать, как изменится специфичность сенсора.

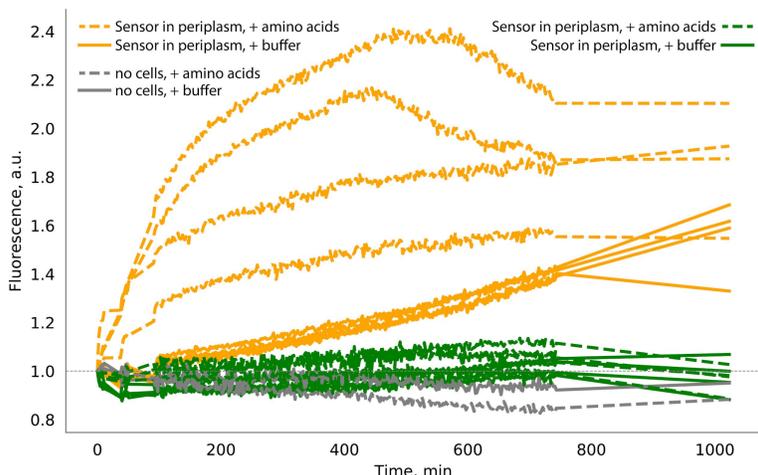
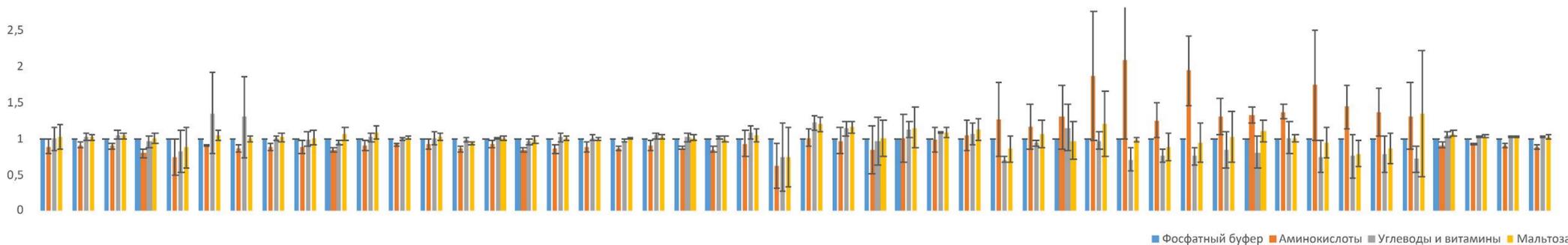


Электрофорез мутантных фрагментов гена мальтозного сенсора (А), колонии *E. coli*, выросшие после трансформации библиотекой векторов (Б).

Мы синтезировали библиотеку вариантов гена мальтозного сенсора из олигонуклеотидов и клонировали ее в экспрессионные векторы для *E. coli*. Колонии, получившие мутантные варианты мальтозного сенсора, отбирали бело-голубой селекцией. В одном из использованных векторов белок производился в цитоплазме, в другом — секретирувался в периплазму.

Меняют ли мутации специфичность мальтозного сенсора?

Мы протестировали ответ 100 мутантных вариантов сенсора на смесь углеводов и витаминов, аминокислот, а также на мальтозу. Протестированные нами мутанты не реагировали на присутствие мальтозы или смеси углеводов/витаминов. У нескольких мутантов значения флуоресценции возрастали в 1.5-2 раза при добавлении смеси аминокислот.



При добавлении аминокислот к бактериям, секретирующим сенсоры в периплазму, происходит нарастание интенсивности флуоресценции в течение нескольких часов. Природа этого эффекта не ясна и может быть связана с физиологическим ответом бактерий на аминокислоты.

Выводы

Мы обнаружили варианты мальтозного сенсора, потенциально реагирующие на компоненты смеси аминокислот. Необходима дальнейшая проверка их активности на препаратах очищенного белка.

Мы обнаружили неизвестный ранее эффект добавления аминокислот на яркость флуоресцентных белков, экспрессируемых в периплазме.

Протестированная нами методика позволяет получать воспроизводимые данные о функциональности флуоресцентных сенсоров.