

УДК 577

Н.В.Мохова (5 курс, каф. БФ), О.Л.Рунова, к.б.н. (ВНИИЭМ РАМН)

## БЕЛОК КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЙ ЛИПОПРОТЕИНЫ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ ЧЕЛОВЕКА: ЕГО ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА

В рамках программы разработки новых методов диагностики и лечения атеросклероза в отделе молекулярной генетики НИИЭМ РАМН была проведена работа по изучению функциональной активности рекомбинантного лигандсвязывающего домена РЛНП человека, экспрессированного в клетках *E. coli*, и был обнаружен белок, взаимодействующий с ЛНП человека. В литературе не имелось сведений о прокариотическом белке с подобной специфичностью. Изучение ЛНП представлено связано с разработкой новых, дешевых и эффективных сорбентов для удаления липопротеинов из крови больных с повышенным содержанием холестерина, что является актуальной задачей медицины. Помимо этого, актуальность данного исследования обусловлена возможностью создания простой безклеточной тест-системы для изучения структурных аномалий ЛНП-частиц и их белковых компонентов. Таким образом было необходимо разработать метод выделения белка кишечной палочки, связывающего липопротеины низкой плотности человека, и изучить его свойства; исследовать несколько лабораторных штаммов *E. coli* (DH5 $\alpha$ , TG-1, JM-109) на предмет наличия в них белков, специфически связывающих липопротеины низкой плотности человека; определить их молекулярную массу; исследовать характер взаимодействия данных белков с липопротеинами и определить степень сродства белков к ЛНП (вычислить константу диссоциации комплекса белок/ЛНП).

Выделение белка проводили с помощью хроматографии на смоле His-Bind с иммобилизованными ионами никеля. Пробы белка на всех стадиях очистки анализировали в 7,5% ПААГ с SDS, как в присутствии дитиотреитола, так и без. Антитела к ЛНП-связывающему белку *E. coli* получали стандартным методом - путём иммунизации кроликов. Проверку специфической активности полученных антител осуществляли методом дот-иммуноблоттинга. Определение эффективности взаимодействия липопротеинов низкой плотности с бактериальным белком проводили методом лигандного блоттинга. Для количественной оценки связывания ЛНП человека белком *E. coli* был использован иммунохимический тест.

Анализ полученных данных показал, что хроматографически очищенный бактериальный белок с молекулярной массой 48 кДа высокоэффективно взаимодействует с ЛНП человека. Графическая обработка результатов по методу Скетчарда свидетельствует, что это взаимодействие носит насыщающий характер, и позволила определить константу диссоциации комплекса бактериальный белок/ЛНП как половину от максимального значения связывания ЛНП. Таким образом рассчитанная константа диссоциации равнялась 4мкг/мл или  $7,3 \times 10^{-9}$  М. Для комплекса рецептор ЛНП человека/лиганд ЛНП константа диссоциации составляет 10...15 мкг/мл или  $(18...27) \times 10^{-9}$  М. Сравнивая эту величину с полученной нами константой, можно сказать, что взаимодействие ЛНП с бактериальным белком почти столь же эффективно, как и с их природным рецептором.

*Выводы:*

1. Из лабораторных штаммов *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS, TG-1, DH5 $\alpha$  и JM-109 выделен белок, специфически взаимодействующий с липопротеинами низкой плотности человека.
2. Получены антитела к ЛНП-связывающему белку *Escherichia coli*.

3. Определена молекулярная масса бактериального белка, взаимодействующего с липопротеинами низкой плотности человека.
4. Определена константа диссоциации комплекса белка *E. coli* с ЛНП.