

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201500724** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2016.11.30

(22) Дата подачи заявки
2015.05.28

(51) Int. Cl. **C12Q 1/00** (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)

**(54) СПОСОБ IN VIVO МЕЧЕНИЯ БЕЛКОВ ПРИ СБЛИЖЕНИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
БИОТИН ЛИГАЗЫ BirA И ПЕПТИДОВ АКЦЕПТОРА БИОТИНА ВАР1070 И ВАР1108**

(96) KZ2015/022 (KZ) 2015.05.28

(71) Заявитель:
**РЕСПУБЛИКАНСКОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ НА ПРАВЕ
ХОЗЯЙСТВЕННОГО ВЕДЕНИЯ
"НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
БИОТЕХНОЛОГИИ" КОМИТЕТА
НАУКИ МИНИСТЕРСТВА
ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН (KZ)**

(72) Изобретатель:
**Кулыясов Арман Табылович,
Раманкулов Ерлан Мирхайдарович
(KZ), Огрызко Василий Викторович
(FR)**

(57) Изобретение относится к генной инженерии, биохимии, биотехнологии, клеточной биологии и протеомике и может быть использовано для создания метода ранней диагностики рака. Предлагаемый метод основан на специфическом мечении взаимодействующих (или сближенных) белков in vivo. Целью изобретения является специфическое детектирование взаимодействия (сближения) белков с использованием биотин-лигазы BirA и пептидов акцептора биотина ВАР. Технической задачей изобретения является улучшение метода детектирования белок-белкового взаимодействия на основе пары BirA/ВАР. В сравнении с подходом, где применяют дорогие стабильные изотопы (метод SILAC), предлагаемый метод отличается меньшей стоимостью. Поставленная техническая задача достигнута заменой в пептиде ВАР валинового остатка на гистидиновый. Сконструированы два варианта пептида ВАР1070 и ВАР1108. На примере модели взаимодействий гетерохроматиновых белков HP1 α и HP1 γ показано, что полученные пептиды, обладают близким динамическим диапазоном биотинилирования и одинаковым уровнем экспрессии в клетках, но различными величинами m/z, что позволяет проводить более точные мультиплексные эксперименты для изучения белок-белковых взаимодействий in vivo. Дополнительным преимуществом данного метода является возможность изучения белок-белковых взаимодействий в динамике.

A1

201500724

201500724

A1

СПОСОБ *IN VIVO* МЕЧЕНИЯ БЕЛКОВ ПРИ СБЛИЖЕНИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТИН ЛИГАЗЫ BirA И ПЕПТИДОВ АКЦЕПТОРА БИОТИНА VAR1070 и VAR1108

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предпосылка изобретения

Одной из важнейших задач биологии является полное определение состава живой клетки и его компартментов, а также реконструкция пространственной структуры на молекулярном уровне и в динамике (Wodak Sh.J., Vlasblom J., Turinsky A.L., Pu Sh. Protein-protein interaction networks: the puzzling riches // Curr. Opinion in Struct. Biol.- 2013.-Vol.23, Issue 6.-P.941-953). Для решения этой задачи в первую очередь необходимо выявить, и систематизировать близость между различными компонентами в клетке и осуществлять их мониторинг во времени и в зависимости от физиологического состояния (Wells J.A., McClendon Ch.L. Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces // Nature.-2007.-Vol.450, No.13.-P.1001-1009.). При этом белок-белковые взаимодействия (Protein-protein interactions, PPI) являются частным случаем более общих типов динамической самоорганизации в создании пространственно-временного порядка внутри клетки. Таким образом, детектирование сближения между белками может предоставить информацию не только об их взаимодействии, но и выявить некоторые аспекты пространственной организации *in vivo*, которые невозможно получить из экспериментов *in vitro* (Mosca R., Pons T., Ceol A., Valencia A., Aloy P. Towards a detailed atlas of protein-protein interactions // Curr. Opinion in Struct. Biol.- 2013.-Vol.23, Issue 6.- P.929-940). Белок-белковые взаимодействия являются молекулярной основой большинства физиологических процессов, как в здоровой, так и в больной клетке. В случае возникновения рака PPI выполняют значимые регуляторные функции, например, в клеточном делении или передаче сигнала в клетке (Westermarck J., Ivaska J., Corthals G.L. Identification of protein interactions involved in cellular signaling // Mol. Cell. Proteomics.-2013.-Vol.12, No.7.-P.1752-1763). Специфичность и аффинность этих взаимодействий чрезвычайно важна, поскольку их изменения приводят к неправильному функционированию клетки, как, например, неконтролируемый клеточный рост, характерный для развития опухоли (Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: The next generation // Cell.-2011.-Vol.144.-P.646-674). В связи с этим, фармацевтическая индустрия сейчас крайне заинтересована в поиске и разработке модуляторов PPI – биологических агентов (таких как антитела) или небольших синтетических соединений для нужд медицины (Milroy L.-G., Grossmann T.N., Hennig S., Brunsveld L., Ottmann Ch. Modulators of protein-protein interactions // Chem. Rev.-2014.-Vol.114, Issue 9.-P.4695-4748). На сегодняшний день более 12 низкомолекулярных модуляторов PPI проходят клинические испытания, а прогнозы по их продажам во всем мире в течение ближайших 5 лет

оцениваются в объеме 800 миллионов долларов США (Nero T.L., Morton C.J., Holien J.K., Wielens J., Parker M.W. Oncogenic protein interfaces: small molecules, big challenges // Nature Rev./Cancer.-2014.-Vol.14.P.248-262; Ivanov A.A., Khuri F.R. Fu H. Targeting protein-protein interactions as an anticancer strategy // Trends in Pharm. Sci. -2013.-Vol.34, No.7.-P.393-400; 9. Arkin M.R., Tang Y., Wells J.A. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: Progressing toward the reality // Chem. & Biol.-2014.-Vol.21, Issue 9.-P.1102-1114). Поэтому разработка методов детектирования и количественной оценки белок-белковых взаимодействий *in vivo* является **актуальной задачей**, позволяющей помочь в создании лекарственных средств - модуляторов PPI.

В настоящее время существует несколько подходов для мониторинга белок-белкового сближения внутри живой клетки, среди которых следует отметить такие методы как FRET, BRET (Boute N., Jockers R., Issad T. The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET. Trends Pharmacol. Sci.- 2002. – Vol.23. - P.351–354), PCA и различные виды двух-гибридных систем (Lievens S., Lemmens I., Tavernier J. Mammalian two-hybrids come of age. Trends Biochem. Sci. 2009.-Vol.34.-P. 579–588). Однако они имеют определенные ограничения, как, например, невысокая чувствительность, небольшой динамический диапазон или детектирование сближения на коротких расстояниях (1-10 нм). Одним из перспективных подходов для решения этих проблем является метод, основанный на использовании пары фермент/субстрат, который позволяет пометить взаимодействующий или близко расположенный белок с помощью ковалентно-связанной метки. Меченые пептиды в дальнейшем можно анализировать с помощью Вестерн-блота, масс-спектрометрии или конфокальной микроскопии. Масс-спектрометрия является стандартным методом протеомики, позволяющий различать тысячи ионов с различными значениями величины m/z (отношение массы иона к заряду) и достоверно идентифицировать практически все белки, а также предоставляющим возможность мультиплексирования или мониторинга нескольких взаимодействий в одном эксперименте (Westermeier R., Naven T., Höpker H.-R. Proteomics in practice.-Weinheim:Wiley-VCH Verlag-GmbH, 2008.-482p.). Однако для приготовления образца требуется полностью лизировать клетку и, таким образом, информация о пространственном расположении и динамике внутри клетки становится недоступной (Von Hagen J. Proteomics sample preparation.- Weinheim:Wiley-VCH Verlag-GmbH, 2008.-453p.).

Конфокальная микроскопия, напротив, предоставляет пространственную информацию внутри живой клетки (Pawley James. Handbook of biological confocal microscopy. Third edition.-2006.-Springer-349p.). Оба метода имеют определенные недостатки, но в то же время обладают набором взаимодополняемых достоинств (рисунок 1), сочетание которых позволит получить наиболее полную и детальную информацию о процессах, происходящих внутри живой клетки.

Детальное описание изобретения

Изобретение относится к генной инженерии, биохимии, биотехнологии, клеточной биологии и протеомике, и может быть использовано для создания метода ранней диагностики рака.

Предлагаемый метод основан на специфическом мечении взаимодействующих (или сближенных) белков *in vivo*. Целью изобретения является специфическое детектирование взаимодействия (сближения) белков с использованием биотин-лигазы (BirA) и пептида акцептора биотина (Biotin Accepting Peptide - BAP), который распознается ферментом BirA (рисунок 2). Например, если интересующий нас белок А конъюгирован с BirA, в то время как другой белок В конъюгирован с BAP, то в случае взаимодействия или сближения исследуемых белков А и В друг с другом, фермент будет катализировать сайт-специфичное ковалентное присоединение биотина к пептиду BAP, что можно определить с помощью Вестерн-блота, масс-спектрометрии или конфокальной микроскопии.

Для практического осуществления этой идеи сконструированы два типа векторов – для экспрессии белков слитых с BirA и для экспрессии белков слитых с BAP (рисунок 3). Причем каждый тип вектора сконструирован в двух формах, регулирующих экспрессию белка с помощью сильного CMV (Cytomegalovirus) или слабого MoMuLV (Moloney murine leukemia virus) промоторов. Поскольку белок, слитый с ферментом BirA, многократно, без изменений, участвует в реакциях мечения биотином, то его количество по отношению к субстрату (белку, слитому с BAP) должно быть на много меньше (мишени BAP-B >> лигазы BirA-A). Поэтому для трансфекции можно использовать две плазмиды - CMV.BAP.B для экспрессии большого количества мишеней и MoMuLV.BirA.A для экспрессии минимально необходимого количества лигаз, что является крайне важным для количественного анализа.

В составе аминокислотной последовательности пептида BAP введены два фланкирующих остатка аргинина, который после трипсинолиза образует пептид, позволяющий идентифицировать его методом хромато-масс-спектрометрии LC-MS/MS (обозначен как BAP/MS на рисунке 3). Причем, для экспериментов предложены два варианта этого пептида, в одном имеется валиновый остаток (BAP1070), а в другом он заменен на гистидиновый (BAP1108), что позволяет проводить мультиплексные эксперименты с двумя типами меток, отличающимися величиной m/z (рисунок 3). В структуре плазмиды имеется также консенсусная Kozak последовательность ACCATG перед BAP, необходимая для инициации трансляции в эукариотических клетках (Kozak M. // J. Cell Biol., 1991, V.115, N.4, P.887–903). Наряду с остатками аргинина в структуре домена BAP имеется также 7XHis маркер, для возможности очистки или/и мониторинга количества белка-мишени вне зависимости от статуса его биотинилирования.

Для проверки того, что спроектированные пептиды BAP биотинилируются лигазой BirA, проведен модельный эксперимент с

трансфекцией клеток HEK293T плазмидами MoMuLV.BirA.GFP и CMV.BAP.GFP. Несмотря на то, что белок GFP может образовывать димеры (Chalfie M., Kain S.R. Green Fluorescent Protein: Properties, Applications, and protocols; Wiley-Liss: New York, 1998), основная цель эксперимента заключалась не в детектировании взаимодействия GFP-GFP, а в тестировании биотинилирования пептида BAP, поскольку даже фоновое биотинилирование, обусловленное случайными столкновениями между не взаимодействующими белками, может вызвать заметно-детектируемый сигнал. В результате проведенных опытов не только удалось обнаружить уровень биотинилирования BAP-GFP, но и оказалось, что он практически линейно зависит от времени инкубации клеток биотином (рисунок 4).

Следует отметить, что в параллельном эксперименте, где проводили котрансфекцию GFP, слитую с другой последовательностью BAP (MAGLNDIFEAQKIEWHE), использованной ранее (Viens A., Mechold U., Lehrmann H., Harel-Bellan A., Ogryzko V. Use of protein biotinylation *in vivo* for chromatin immunoprecipitation.// Anal. Biochem.-2004.-325.-P.68-76) биотинилирование проходило с большей скоростью (время полунасыщения – 15 минут, в сравнении с 680 минутами для новой последовательности BAP1070 и 700 минут для BAP1108). Вследствие того, что насыщение уровня биотинилирования BAP затухает, разница в эффективности биотинилирования, то более медленная кинетика биотинилирования новой последовательности пептида BAP позволяет проводить более точную корреляцию биотинилирования BAP и белок-белкового сближения.

Поскольку в клетках млекопитающих требуется экспрессия бактериального биотинилирующего фермента BirA, то необходимо создание гуманизированной версии этого белка. Аминокислотная последовательность BirA является кодон-оптимизированной, где наиболее редкие кодоны заменены кодонами, наиболее часто используемыми в человеческих клетках. Гуманизированная версия BirA, которая используется в этом методе, имеет более высокую экспрессию в клетках, что приводит к лучшему биотинилированию *in vivo* (Mechold U., Gilbert C., Ogryzko V. Codon optimization of the BirA enzyme gene leads to higher expression and an improved efficiency of biotinylation of target proteins in mammalian cells// Journal of Biotechnology.- 2005.- Vol.116.-P.245-249).

Наиболее близкими прототипами предлагаемого метода являются методы, основанные на использовании биотин лигазы BirA и пептида акцептора биотина AP(-3) (Fernandez-Suarez, M.; Chen, T. S.; Ting, A. Y. Protein-protein interaction detection *in vitro* and *in cells* by proximity biotinylation // J. Am. Chem. Soc.-2008.-No.130.-P.9251–9253) или пептида BAP (Kulyyassov A., Shoaib M., Pichugin A., Kannouche P., Ramanculov E., Lipinski M., Ogryzko V. PUB-MS: A Mass Spectrometry-based Method to Monitor Protein-Protein Proximity *in vivo* //J. Proteome Res.-2011.-Vol.10, No.10.-P.4416-4427).

Недостатком первого прототипа, где используется пептид AP(-3) является узкий динамический диапазон времени мечения биотином. Для получения разницы в сигналах биотинилирования авторы этой работы проводили мечение за 1 минуту до лизирования клетки. **Недостатком второго прототипа**, несмотря на широкий динамический диапазон времени мечения, является ухудшение экспрессии белков в случае замены валинового остатка (V) на фенилаланиновый (F), либо осложнение обнаружения и количественной оценки, из-за побочной реакции пропионилирования остатка тирозина в случае замены V→Y.

Технической задачей изобретения является улучшение метода детектирования белок-белкового взаимодействия на основе пары BirA/BAP путем подбора дополнительного нового пептида с близкими значениями кинетики мечения биотином, с одинаковым уровнем экспрессии и без осложнений побочной реакцией с пропионовым ангидридом. Необходимость в разработке нового пептида обусловлена потребностью использования его в экспериментах с мультиплексированием, позволяющим проводить одновременный мониторинг двух взаимодействии внутри клетки. В сравнении с методом, где применяют дорогие стабильные изотопы (метод SILAC, Ong S.E., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D.B., Steen H., Pandey A., Mann M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics // 2002.-Molecular & Cellular Proteomics.-Vol.1, No.5.-P.376–386), мультиплексный подход выгодно отличается дешевизной. Поставленная техническая задача достигнута заменой в пептиде BAP валинового остатка на гистидиновый V→H.

Отличием предлагаемого метода от прототипов является возможность использования двух пептидов BAP1070 и BAP1108, обладающих близкими динамическими диапазонами биотинилирования и одинаковыми уровнями экспрессии в клетках, но различными величинами m/z, что позволяет проводить более точные мультиплексные эксперименты для изучения белок-белковых взаимодействии *in vivo*.

Конструирование плазмиды pcDNA3.1(+).BAP1108.H2Az

Для получения плазмиды с новым вариантом пептида акцептора биотина BAP1108 проведен дизайн олигонуклелидов-праймеров, содержащих сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции KpnI и XbaI, что позволило провести клонирование по этим сайтам в векторную плазмиду pcDNA3.1(+).

Праймеры (двойное подчеркивание сайтов рестрикции KpnI и XbaI, одинарное подчеркивание сайтов BglII, XhoI и NotI, жирным шрифтом указана последовательность Kozak):

Primer 1 NKpnIBAD:

SACACACAGGTACCAGATCTTGAACCATGGGACACCATCACCATCACCAT
CATGGCCTGACA

Primer 2 NXhoIBAD:

CATCACCATCATGGCCTGACAAGAATCCTGGAAGCTCAGAAGATCCAC
AGAGGAGGCCCTCGAG

Primer 3CH2AZNotXba IAS:

TGTGTGTGTCTAGAGCGGCCGCTAGACAGTCTTCTGTTGTC

ПЦР проводили в два раунда. В качестве матрицы для первого раунда ПЦР-амплификации BAP1108-H2Az использовали плазмиду pOz.BAP1135.H2Az (вариант пептида BAP с тирозином Y). Условия ПЦР: денатурация 94 °C - 15 сек, отжиг 54 °C - 30 сек, элонгация 72 °C - 1 мин, количество циклов - 20.

После первого раунда ПЦР продукты реакции разделяли методом электрофореза в 0.8% агарозном геле, затем окрашивали с помощью бромистого этидия и с помощью скальпеля вырезали фрагмент, соответствующий по размеру ампликону (размер около 400 п.н.). Затем вырезанный кусочек геля, содержащий ампликон помещали в пробирки, из набора для выделения ДНК из агарозного геля фирмы Millipore (номер по каталогу LSKGEL050) и центрифугировали при 5000 g, 10 мин. Полученный раствор с очищенным ампликоном использовали для второго раунда ПЦР.

В каждом раунде ПЦР смешивали смеси 1 и 2 и загружали в ПЦР амплификатор (таблица 1). Часть продуктов ПЦР-реакции (10 мкл или 1/5 часть от объема) для визуализации подвергали электрофорезу в 0.8% агарозном геле, затем окрашивали с помощью бромистого этидия. Оставшуюся часть ПЦР-продуктов (40 мкл) помещали в пробирки с фильтрующими элементами из набора для очистки продуктов ПЦР фирмы Millipore (номер по каталогу P36461, Rev. A, 03/05) и добавляли 300 мкл воды. Откручивали в центрифуге при 1000 g, в течение 15 мин, для удаления солей и праймеров. Далее в фильтрующий элемент, содержащий амплифицированную ДНК, добавляли 20 мкл воды, переворачивали, вставляли в новую пробирку из набора и центрифугировали 2 мин при 1000 g.

Полученный ампликон BAP1108-H2Az клонировали в вектор pcDNA3.1(+). Векторную ДНК pcDNA3.1(+).BAP1070.HP1γ (1 мкг), а также продукт ПЦР-амплификации BAP1108-H2Az подвергали гидролизу рестриктазами KpnI и XbaI (20 е.а. в 20 мкл реакционной смеси) в соответствующих буферных растворах при 37 °C в течение 2 часов. Гидролизат разделяли электрофорезом в 0.8% агарозном геле, затем окрашивали с помощью бромистого этидия. Визуализированные в УФ-свете фрагменты вырезали, помещали кусочки геля в пробирки, из набора для выделения ДНК из агарозного геля фирмы Millipore (номер по каталогу LSKGEL050) и центрифугировали при 5000 g, 10 мин. Лигирование полученных на предыдущей стадии вектора и фрагмента ДНК осуществляли с помощью лигазы фага T4 в течение ночи при 4 °C.

После трансформации компетентных клеток *E. coli* штамма DH5α, и отбора клонов, несущих рекомбинантные плазмиды со встроенным геном, получали плазмиду pcDNA3.1(+).BAP1108.H2Az из которого заменой рамки считывания H2Az на другие гены (HP1α, HP1β, HP1γ, H2A) с помощью

рестриктаз XhoI и NotI получали плазмиды, использованные в следующих примерах.

Таблица 1 - Состав смесей 1 и 2 для синтеза BAP1108-H2Az

Первый раунд ПЦР				
Смесь 1 (объем 25 мкл)		Смесь 2 (объем 25 мкл)		
	Компоненты	Объем, мкл	Компоненты	Объем, мкл
1	Primer 2 NXhoIBAD	0.5	10x буфер ПЦР	5.0
2	Primer 3CH2AZNotXba IAS	0.5	MgSO ₄	5.0
3	pOz.BAP1135.H2Az (200 мкг)	0.5	Pwo полимераза	0.5
4	H ₂ O	18.5	H ₂ O	14.5
5	dNTP (2,5 mM)	5.0		
Второй раунд ПЦР				
Смесь 1 (объем 25 мкл)		Смесь 2 (объем 25 мкл)		
	Компоненты	Объем, мкл	Компоненты	Объем, мкл
1	Primer 1 NKpnIBAD	0.5	10x буфер ПЦР	5.0
2	Primer 3CH2AZNotXba IAS	0.5	MgSO ₄	5.0
3	Смесь с первого раунда ПЦР	0.1	Pwo полимераза	0.5
4	H ₂ O	18.9	H ₂ O	14.5
5	dNTP (2,5 mM)	5.0		

Сущность изобретения поясняется следующими примерами конкретного выполнения изобретения.

Пример 1. Количественная оценка гетерологичного белок-белкового взаимодействия паралога гетерохроматинового белка HP1 α и HP1 γ .

Белки HP1 образуют семейство на основании наличия в их структуре двух консервативных доменов: хромодомена (CD) и хромошэдоу домена (CSD), разделенных гибким звеном (Lombert G., Wallrath L., Urrutia R. The Heterochromatin Protein 1 family // Genome Biol.-2006.- Vol. 7, Issue 7.-P.228.1-228.8). Геном мыши кодирует три вида HP1 α , HP1 β и HP1 γ с функциями аналогичными белкам из *Drosophila* (Singh P.B., Miller J.R., Pearce J., Kothary R., Burton R.D., Paro R., James T.C., Gaunt S.J. A sequence motif found in a Drosophila heterochromatin protein is conserved in animals and plants // Nucleic Acids Res.-1991.-Vol. 19, № 4.-P.789-794). Родственные три вида белков HP1 закодированы также в геноме человека (Minc E., Allory Y., Courvalin J.C., Buendia B. Immunolocalization of HP1 proteins in metaphasic mammalian chromosomes // Methods Cell Sci.- 2001.-Vol. 23, Issue 1-3.-P.173-176). HP1 α является прогностическим маркером на наличие рака в организме человека

(US Patent US2012/0046190 A1, 23 февраля 2012), изменение экспрессии которого в опухолевых клетках, в сравнении со здоровыми клетками позволяет достоверно диагностировать рак молочной железы и опухоль мозга (Dialynas G. K., et al.// Mutation Research, 2008, V.647, Issue 1-2, P.13–20), рак мочевого пузыря, яичников и поджелудочной железы (De Koning L., et al. // EMBO Mol Med., 2009, V.1, Issue 3, P.178–191). Гетерохроматиновые белки HP1 образуют олигомеры, благодаря наличию в структуре CSD домена.

Процент гомологии в аминокислотной последовательности участка CSD домена между паралогами гетерохроматиновых белков млекопитающих HP1 α и HP1 β составляет 70-90%. Эта же величина между HP1 α и HP1 γ составляет более 90% (Zeng W., Ball A.R., Yokomori K. HP1: heterochromatin binding proteins working the genome.// Epigenetics.-2010.-Vol.5, No.4.-P.287-292). Рамка считывания (ORF) гена белка HP1 α состоит из 575 п.н., а молекулярная масса белка 22,23 кДа. ORF HP1 β – 558 п.н., а масса 21,42 кДа. ORF HP1 γ – 552 п.н., а масса белка 20,81 кДа.

Чтобы проверить пригодность двух пептидов BAR1070 и BAR1108 для мультиплексных экспериментов, использовали плазмиды, в которых они конъюгированы с HP1 α и HP1 γ . Выбор именно этих паралогов гетерохроматинового белка обусловлен тем, что они имеют наибольшее отличие по молекулярной массе и поэтому их легче разделить с помощью белкового электрофореза. Кроме того, CSD домены HP1 α и HP1 γ , ответственные за белок-белковое взаимодействие, имеют более высокую гомологию, в сравнении с HP1 β . Ранее было установлено, что степень гомологичного взаимодействия HP1 α -HP1 α и HP1 β -HP1 β примерно одинакова в пределах ошибки эксперимента, несмотря на большую разницу в последовательности CSD доменов (Кулыясов А.Т., Жубанова Г.С., Раманкулов Е.М., Огрызко В.В. Метод количественной оценки взаимодействий гетерохроматинового белка HP1 *in vivo* // Биотехнология. Теория и практика.-2014.-№1.-С.17-27). Эти результаты, свидетельствуют также о небольшой разнице между эффективностью взаимодействий HP1 α -HP1 α и HP1 α -HP1 γ что можно использовать для тестирования нового варианта пептида BAR1108.

Протокол транзientной трансфекции клеток НЕК293Т.

За 1 день до трансфекции посеяли 200,000 клеток НЕК293Т в каждую лунку 6 луночной планшеты в 2 мл среды DMEM, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки и 1% смеси антибиотиков пенициллинна и стрептомицина. На следующий день за 1 час до трансфекции поменяли среду на свежую 2 мл DMEM. Для проведения трансфекции в расчете на 1 лунку пригостили по две пробирки на 1.5 мл, промаркированные 0А, 0В (1А, 1В или 2А, 2В). В одну пробирку (раствор А) загрузили 220 мкл воды, 31 мкл 2М раствора хлорида кальция и рассчитанное, согласно таблице 2 внизу, количество плазмидных ДНК. Во вторую пробирку (раствор В) загрузили 250 мкл буферного раствора 2xHBS (Состав 2xHBS на 200 мл): Нерес 2 г, KCl 0.15 г, Глюкоза 0.4 г, NaCl 3.2 г, Na₂HPO₄ 0.0426 г, pH должно составить 5.9,

довели pH до 7.0 добавлением небольшими порциями 1N р-ра NaOH, отфильтровали через стерильный фильтр фирмы Millipore и хранили при 4 °C). Затем медленно по каплям добавляли раствор А к раствору В, оставляли на 15 минут и затем добавляли полученную смесь к клеткам НЕК293Т.

На следующий день поменяли среду на новую DMEM. За 10 или 30 минут до сбора клеток поменяли среду на DMEM, приготовленную добавлением 10 мкл раствора биотина (1мг/мл) и 100 мкл 50 mM HEPES (pH 7.35) к 2 мл среды (мечение биотином 10 и 30 минут). Для сбора клеток удалили среду, затем добавили 1 мл раствора PBS, ресуспендировали и перенесли в пробирку на 1.5 мл. Затем пробирки центрифугировали при +4 °C, 700 rcf, 5 минут, удаляли супернатант и добавляли к клеткам по 100 мкл раствора буфера CSK, содержащего 0,5% тритона (Состав CSK - 100 mM NaCl, 300 mM сахароза, 10 mM Tris, pH 7.5, 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1.2 mM PMSF, 0.5% Triton X-100), пипетировали несколько раз и центрифугировали при 4000 rpm, 5 минут.

В результате на данном этапе метода были получены ядра клеток НЕК293Т, которые можно было заморозить до -20 °C или сразу добавить 80 мкл буфера CSK без тритона, подвергнуть соникированию (для разрушения геномной ДНК и уменьшения вязкости) и добавить 40 мкл загрузочного буфера 3X (Состав на 10 мл: 2,4мл 1М Трис, pH6.8, 0.8г SDS, 4 мл глицерина, 0.01% бромфенолового синего, 1 мл бета-меркаптоэтанола и 2.8 мл воды). Пробирки встряхнули, нагрели при 98 °C (5 минут) и открутили на миницентрифуге на максимальной скорости. Электрофорез и иммуноблоттинг образцов осуществляли согласно методике из сборника (Higgins S.J., Hames B.D. Protein Expression. A practical approach, Oxford University Press, 1999, 282p).

На рисунке 5 приведены результаты иммуноблоттинга образцов, полученных из ядер клеток НЕК293Т. Уровень экспрессии рекомбинантных белков-мишеней, который пропорционален интенсивностям сигналов на мембранах, обработанных антителами α -His, заметно не изменяется при замене VAR1070 на VAR1108, как для HP1 α так и для HP1 γ . Следует отметить, что это связано с тем, что для трансфекции использовали плазмиды с близкими значениями A260/280 (таблица 2). В качестве контроля в этих экспериментах использовали трансфекцию без плазмид (образцы 0 и 0') или трансфекцию, где в качестве мишеней брали VAR-HP1 β и VAR-GFP.

Уровень биотинилирования VAR-HP1 β (нижний блот, образец 1, рисунок 5) оказался сопоставимым с уровнем для образцов 2 и 3, показывающим уровень взаимодействия BirA-HP1 γ +VAR-HP1 α +VAR-HP1 γ . Аналогично уровни биотинилирования BirA-HP1 γ +VAR-HP1 α и BirA-HP1 γ +VAR-HP1 γ также оказались близкими. В то же время в экспериментах с заменой BirA-HP1 α +VAR-HP1 α и BirA-HP1 α +VAR-HP1 γ также наблюдалась картина с близким уровнем биотинилирования (образцы 2' и 3'). В качестве

контроля в этом эксперименте использовали BAP-GFP (образец 1'), который, несмотря на высокую экспрессию (согласно интенсивностям пятен на мембране α -His) и более длительное время мечения биотином (30 минут), не показал сигнал на мембране, обработанном конъюгатом стрептавидин-HRP, поскольку HP1 не взаимодействует с белком GFP.

Таблица 2 – Расчет количеств плазмид для трансфекции

Плазида	C, нг/мкл	A260/280	Кол-во, мкг	Объем, мкл
CMV.BAP1070.HP1 α	289	1.86	1	3.4
CMV.BAP1070.HP1 γ	370	1.86	1	2.7
CMV.BAP1108.HP1 α	393	1.87	1	2.6
CMV.BAP1108.HP1 γ	277	1.87	1	3.6
CMV.BAP1070.HP1 β	280	1.86	1	3.5
CMV.BAP1070.GFP	200	1.85	0.5	2.5
CMV. BirA.HP1 α	99	1.83	0.2	2.0
CMV. BirA.HP1 γ	121	1.72	0.2	0.8

Протокол подготовки образца для LC-MS/MS

Фрагмент геля от предыдущего эксперимента с дорожкой от цветного белкового маркера отмывали в 30 мл дистиллированной воды 2 часа. Затем воду слили и с помощью скальпеля вырезали кусок геля, ориентируясь на сигналы белков HP1 α и HP1 γ на Вестерн-блоте относительно цветного белкового маркера. Вырезанные куски геля поместили в свободные от кератина пробирки Эппендорф на 1.5 мл.

Обработка образца пропионовым ангидридом

Перед началом реакции образец промыли 100 мкл смеси ацетонитрил:50 мМ бикарбонат аммония (1:1) в течение 10 мин при комнатной температуре, а затем удалили супернатант. Кусочки геля обрабатывали 100 мкл смеси 30%-ного пропионового ангидрида в метаноле при 37 °C в течение 1 часа в присутствии 40 мкл 50 мМ бикарбоната аммония (Robin Ph., Fritsch L., Philipot O., Svinarchuk F., Ait-Si-Ali S. Post-translational modifications of histones H3 and H4 associated with the histone methyltransferase Suv39h1 and G9a // Genome Biology.-2007.-Vol.8, Issue12.-P.270.1-270.10). Затем удалили супернатант и промыли кусочки геля для последующей обработки трипсином.

Промывка и трипсинолиз образца

Промывку кусков геля осуществляли сначала 100 мкл смеси ацетонитрил:50 мМ бикарбонат аммония (1:1) в течение 10 мин, затем удалили супернатант и добавили 100 мкл чистого ацетонитрила и перемешивали 10 минут при комнатной температуре. Повторили промывку 3 раза, а затем поместили образцы на SpeedVac на 5 минут для удаления остаточного ацетонитрила. Затем в каждую пробирку добавили по 100 мкл активированного трипсина (Westermeyer R., Naven T., Höpker H.-R. Proteomics

in practice.-Weinheim:Wiley-VCH Verlag-GmbH, 2008.-482p). Активированный трипсин получали прибавлением 15 мкл 190 мМ раствора бикарбоната аммония к 100 мкл раствора гидрохлорида трипсина (Promega, V5280) с концентрацией 13.33 нг/мкл. Пробирки поместили в термошейкер на 3 часа при 37 °С при интенсивном перемешивании. После этого пробирки открыли на центрифуге, а супернатант перенесли в специальную пробирку для анализа на масс-спектрометре. Затем поместили образцы на SpeedVac и открыли пробирки под вакуумом досуха (около 40-60 минут при 40 °С). В каждую пробирку прибавили по 7 мкл раствора для анализа (CH₃CN:H₂O:HCOOH, 3:97:0.1%) и поместили пробирки в автосэмплер хроматомасс-спектрометра (Agilent nanoHPLC 3D 6340 IonTrap). Отнесение пиков на масс-спектрах и идентификацию пептидов после MRM осуществляли их сравнением с теоретически рассчитанными спектрами MS2, полученных с помощью программы Biolynx. Параметры наноВЭЖХ: режим MicroFlow Mode, скорость потока в колонке – 0.6 мкл/мин, время остановки – 16 мин, диапазон давления, минимум – 0 бар, максимум – 150 бар; растворители А: H₂O+0.1% HCOOH, В: 90% CH₃CN+10% H₂O; график времени – 0 мин - 3% В, 12.5 мин - 55% В, 15 мин - 95% В, 15.01 мин - 3% В.

Поскольку пептиды ВАР1070 и ВАР1108 близки по свойствам, т.е. как по уровню экспрессии в клетке, так и по скорости биотинилирования, но отличаются друг от друга величиной m/z , то это позволяет различать их методом LC-MS/MS и проводить мультиплексные эксперименты с одновременным мониторингом двух белков. В качестве модели для этого эксперимента выбрали систему с экспрессией рекомбинантных белков ВАР1070-НР1 α +ВАР1108-НР1 γ +BirA-НР1 γ . На рисунке 6 приведены хроматограммы и спектры MS/MS, показывающие пропионилированные и биотинилированные формы пептидов ВАР1070 и ВАР1108, отличающиеся по величинам m/z и временам удерживания, площади пиков в которых имеют определенные значения, пропорциональные содержанию в образце, что позволяет оценить уровень биотинилирования. Уровень биотинилирования (k_B) вычисляли по формуле $k_B = A_B / (A_B + R_e \times A_P)$, где A_B – площадь пика биотинилированной формы ВАР, A_P – площадь пика пропионилированной формы ВАР.

Коэффициент R_e в формуле, равный 0.1 для обоих пептидов ВАР1070 и ВАР1108, представляет собой отношение эффективностей ионизации биотинилированной формы по отношению к пропионилированной форме пептида (Gao Y. and Wang Y. A Method to Determine the Ionization Efficiency Change of Peptides Caused by Phosphorylation // J. Am. Soc. Mass Spectrom.-2007.-Vol.18.-P.1973–1976), вычисленная с помощью метода SILAC (Ong S.E., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D.B., Steen H., Pandey A., Mann M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics // 2002.-Molecular & Cellular Proteomics.-Vol.1, No.5.-P.376–386).

По результатам анализа данных установлено, что уровень биотинилирования ВАР1070-НР1 α +BirA-НР1 γ составляет 0.47, а уровень биотинилирования ВАР1108-НР1 γ +BirA-НР1 γ равен 0.49. Полученные данные свидетельствуют о том, что нет большой разницы между гомологичным и гетерологичным взаимодействием двух форм гетерохроматинового белка НР1.

Таким образом, показано, что варианты ВАР1070 и ВАР1108 являются оптимальными и удобными пептидами для проведения мультиплексных экспериментов по изучению белок-белковых взаимодействий *in vivo*.

Пример 2. Изменения в динамике состояния хроматина проксимального к белку RAD18.

Отличительная особенность предлагаемого метода заключается в том, что в случае экспрессии белков, в которых ВАР-пептид конъюгирован с гистоном, появляется возможность изучать хроматин в непосредственной близости к интересующему нас белку, конъюгированному с BirA. Более того, этот хроматин также имеет постоянную метку, поскольку при сближении биотин остается ковалентно связанной с мишенью, после того как взаимодействие между ВАР- и BirA-слитыми партнерами будет потеряно, что предоставляет возможность изучения процессов в динамике. Среди возможных потенциальных применений такого типа анализа является изучение транспорта белков, измерение стабильности и последовательных модификации определенной фракции белков, которая была частью комплекса со специфическим белком-партнером.

Для проверки данного предположения была выбрана модель изучения проксимального к белку RAD18 хроматина в специфические времена после биотинилирования. Для этого использовали метод иммуофлуоресцентной конфокальной микроскопии для мониторинга распределения биотинилированного хроматина спустя 6 часов после его мечения BirA-RAD18. За 6 часов до мечения биотином клетки НЕК293Т клетки обрабатывали УФ-светом (мощность 20 Дж/м²), чтобы вызвать образование фокусов, в которых происходит ДНК-репарация и в которых накапливаются белки RAD18 (Sale J.E., Lehmann A.R., Woodgate R. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage // Nature Rev./Mol. Cell.Biol.-2012.-Vol.13.-P.141-152). Затем клетки были либо зафиксированы немедленно после мечения биотином (Pulse labeling) либо интенсивно отмыты от биотина и оставлены в свежей среде на 6 часов до фиксации (Chase labeling). Образцы помеченные как Pulse, показали явную колокализацию белков ВАР-Н2А с фокусами RAD18 (рисунок 7, верхний ряд). Однако, в образцах Chase после 6 часов колокализация биотинилированных фокусов и фокусов RAD18 была значительно менее выражена (рисунок 7, средний и нижний ряд).

Протокол транзientной трансфекции клеток НЕК293Т.

Экспрессию рекомбинантных белков из полученных плазмид рсDNA3.1(+).ВАР.Н2А, рсDNA3.1(+).BirA.Rad18 осуществляли в клетках

НЕК293Т с применением кальций-фосфатного метода (Graham F.L., van der Eb A.J. // Virology.-1973.-Vol.52, No2.-P.456-467) с расчетом количеств плазмид согласно таблице 3. Обработку клеток биотином проводили за 15 минут до сбора клеток. Сбор, выделение ядер и Вестерн-блот образцов осуществляли аналогично приведенной выше методике для примера 1. Часть образца использовали для подготовки на иммунофлуоресцентную конфокальную микроскопию.

Таблица 3 – Расчет количеств плазмид для трансфекции

Плазмида	С, нг/мкл	A260/280	Кол-во, мкг	Объем, мкл
CMV.BAP1108.H2A	500	1.84	0.5	1.0
CMV. BirA.Rad18	1400	1.85	0.3	0.2
CMV. BirA.GFP	1200	1.80	0.2	0.16

Иммунофлуоресцентная конфокальная микроскопия.

Клетки НЕК293Т промыли два раза холодным раствором PBS и фиксировали погружением в метанол при -20 °С на 5 минут. Зафиксированные клетки промыли холодным раствором PBS и затем пермеализировали 0.2%-ным раствором Triton X-100 в PBS в течение 10 минут при 4 °С и подвергли добавочному фиксированию 4%-ным формальдегидом при комнатной температуре 20 минут. Затем клетки промыли раствором PBS.

Блокирование проводили 3%-ным раствором БСА 30 минут при медленном перемешивании. Клетки инкубировали мышинными моноклональными антителами на анти-RAD18 (Abcam; ab57447) с последующей трехкратной отмывкой раствором PBS при комнатной температуре. Затем клетки инкубировали козьими антимышиными вторичными антителами, конъюгированными с Alexa-488 (Invitrogen; A11017) в течение 1 часа (разведение 1/1000). Конъюгаты Streptavidin-Cy3 (Sigma; S-6402) и ToPro (Invitrogen), также были добавлены (отношение 1/500 и 1/1000 соответственно) к той же инкубационной смеси. После 3 часов промывок раствором PBS покровные стекла поместили на стеклянные слайды с использованием среды (Vector Laboratories, H-1000). Клетки визуализировали на конфокальном микроскопе Zeiss LSM 510 Meta используя объектив Plan-Apochromat 63×1.4. Изображения получены с помощью последовательного мультитракового сканирования отдельными длинами волн лазеров при 488 и 543 нм.

Таким образом, еще одним преимуществом данного метода является возможность изучения динамики белок-белковых взаимодействий. Как было показано выше pulse-chase мечение биотином может быть использовано для мониторинга в динамике меченого BAP-слитого белка после взаимодействия его с BirA-слитым белком-партнером. Этот подход представляет особенный интерес для изучения многостадийных внутриклеточных процессов, где меняются взаимодействующие партнеры и свойства этих белков (как например локализация или пост-трансляционная модификация).

СПОСОБ *IN VIVO* МЕЧЕНИЯ БЕЛКОВ ПРИ СБЛИЖЕНИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТИН ЛИГАЗЫ BirA И ПЕПТИДОВ АКЦЕПТОРА БИОТИНА BAP1070 и BAP1108

ПЕРЕЧЕНЬ ФИГУР

Рисунок 1 – Сравнение преимуществ (белый фон) и недостатков (черный фон) конфокальной микроскопии и масс-спектрометрии

Рисунок 2 – Детектирование белок-белкового взаимодействия (сближения) с помощью биотин-лигазы (BirA) и пептида акцептора биотина (BAP).

Рисунок 3 – Дизайн векторов с указанием положения CMV/MoMuLV промоторов и нуклеотидных последовательностей BirA и BAP относительно рамки считывания генов белков A и B.

Рисунок 4 – Новые варианты пептида BAP1070 и BAP1108 биотинилируются с меньшей скоростью по сравнению со старой версией BAP. Вверху. Сравнение биотинилирования новых пептидов BAP (ILEAQKIVR и ILEAQKINR, справа) и старого пептида BAP (MAGLNDIFEAQKIEWNE, слева) в присутствии BirA-GFP по результатам анализа иммуноблотинга. Верхний ряд; сигнал α -6XHis-HRP; нижний ряд; сигнал стрептавидин-HRP. Внизу. Кривые кинетики биотинилирования трех пептидов BAP. Для построения кривой сигнал стрептавидин-HRP нормализовали с учетом соответствующего сигнала α -6XHis-HRP. Для каждого отдельного эксперимента нормализованное значение уровня биотинилирования в каждой точке времени делили на соответствующее значение для временной точки 24 часа этого же эксперимента, который принимали за 100%. На графике приведены усредненные значения трех экспериментов.

Рисунок 5 – Мультиплексный подход определения уровня биотинилирования паралога гетерохроматинового белка HP1 α и HP1 γ с помощью иммуноблотинга. Верхние блоты обработаны антителами α -His-HRP, нижние антибиотинные блоты обработаны конъюгатом стрептавидин-HRP. 0 и 0' – контрольные образцы, обработанные реагентом для трансфекции (фосфатом кальция) без плазмид. Время мечения биотином 10 минут (левые блоты) и 30 минут (правые блоты).

Рисунок 6 – Эксперимент с мультиплексированием с помощью tandemной хромато-масс-спектрометрии LC-MS/MS. Справа: Фрагментация MS/MS пропионилированных и биотинилированных вариантов пептидов BAP1070 и BAP1108 с ионами у- и b-серий. Слева: Хроматограмма экстрагированных ионов (Extracted Ion Chromatogram, EIC) наиболее интенсивных

фрагментированных ионов из соответствующих MS/MS-спектров, полученных в режиме MRM-детекции.

Рисунок 7 – Анализ колокализации фокусов внутри клетки: Уменьшение колокализации между белком Rad18 и биотинилированным хроматином. В верхнем ряду изображения, полученные с помощью конфокальной микроскопии, демонстрирующие строгую колокализацию между белком Rad18 и биотинилированным хроматином в ядрах клеток HEK293T сразу же после 15 минутного мечения биотином (Pulse-labeling). В середине - снимки указывают на различную локализацию белка Rad18 и биотинилированного хроматина после 6 часов с момента 15 минутного мечения биотином (Chase). Внизу – увеличенная область Chase-эксперимента демонстрирующая, что фокусы биотинилирования не колокализуются с фокусами белка Rad18 и наоборот (указано стрелками).

СПОСОБ IN VIVO МЕЧЕНИЯ БЕЛКОВ ПРИ СБЛИЖЕНИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТИН ЛИГАЗЫ BirA И ПЕПТИДОВ АКЦЕПТОРА БИОТИНА BAP1070 и BAP1108

Нуклеотидная последовательность пептида BAP1070 (5' -> 3'):

ACCATGGGACACCATCACCATCACCATCATGGCCTGACAAGAATCCTGGAAGCTCAGAAGATCGTGAGAGGAGGCCTCGA
G

Аминокислотная последовательность пептида BAP1070 (N-конец -> C-конец):
TMGHHHHHHHGLTRILEAQKIVRGGLE

Нуклеотидная последовательность пептида BAP1108 (5' -> 3'):

ACCATGGGACACCATCACCATCACCATCATGGCCTGACAAGAATCCTGGAAGCTCAGAAGATCCACAGAGGAGGCCTCGA
G

Аминокислотная последовательность пептида BAP1108 (N-конец -> C-конец):
TMGHHHHHHHGLTRILEAQKIHRRGGLE

СПОСОБ *IN VIVO* МЕЧЕНИЯ БЕЛКОВ ПРИ СБЛИЖЕНИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТИН ЛИГАЗЫ BirA И ПЕПТИДОВ АКЦЕПТОРА БИОТИНА VAR1070 и VAR1108

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ мечения взаимодействующих (сближенных) белков с использованием биотин-лигазы BirA и двух вариантов пептида акцептора биотина (VAR1070 и VAR1108). Длина пептидов VAR составляет 81 п.н (26 остатков аминокислот), кодирующих последовательности, распознаваемые для мечения биотин лигазой и содержащих следующие конструктивные элементы:

- Консенсусная последовательность Kozak ACCATG на 5'-конце;
- 7×His-tag маркер в положении 10-30 п.н.
- Фланкирующие остатки аргинина R в положении 40 и 67 п.н., необходимые для трипсинолиза и образования пептида для идентификации и анализа с помощью масс-спектрометрии
- Лизиновый остаток в положении 58 п.н. для ковалентного присоединения биотина
- Варианты пептида с аминокислотными заменами в положении 64 п.н. (VAR1070 – V валин, VAR1108 – H гистидин) .

VAR1070

Translations Aligned (5'→3')

	10	20	30	40	50	60	70	80
ACCATGGGACACCATCACCATCACCATCATGGCCTGACAAGAATCCTGGAAGCTCAGAAGATCGTGAGAGGAGGCCTCGAG								
T M G H H H H H H G L T R I L E A Q K I V R G G L E								

VAR1108

Translations Aligned (5'→3')

	10	20	30	40	50	60	70	80
ACCATGGGACACCATCACCATCACCATCATGGCCTGACAAGAATCCTGGAAGCTCAGAAGATCCACAGAGGAGGCCTCGAG								
T M G H H H H H H G L T R I L E A Q K I H R G G L E								

СПОСОБ *IN VIVO* МЕЧЕНИЯ БЕЛКОВ ПРИ СБЛИЖЕНИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТИН ЛИГАЗЫ BirA И ПЕПТИДОВ АКЦЕПТОРА БИОТИНА VAR1070 и VAR1108



Рисунок 1

**СПОСОБ *IN VIVO* МЕЧЕНИЯ
БЕЛКОВ ПРИ СБЛИЖЕНИИ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТИН
ЛИГАЗЫ BirA И ПЕПТИДОВ
АКЦЕПТОРА БИОТИНА ВАР1070
и ВАР1108**

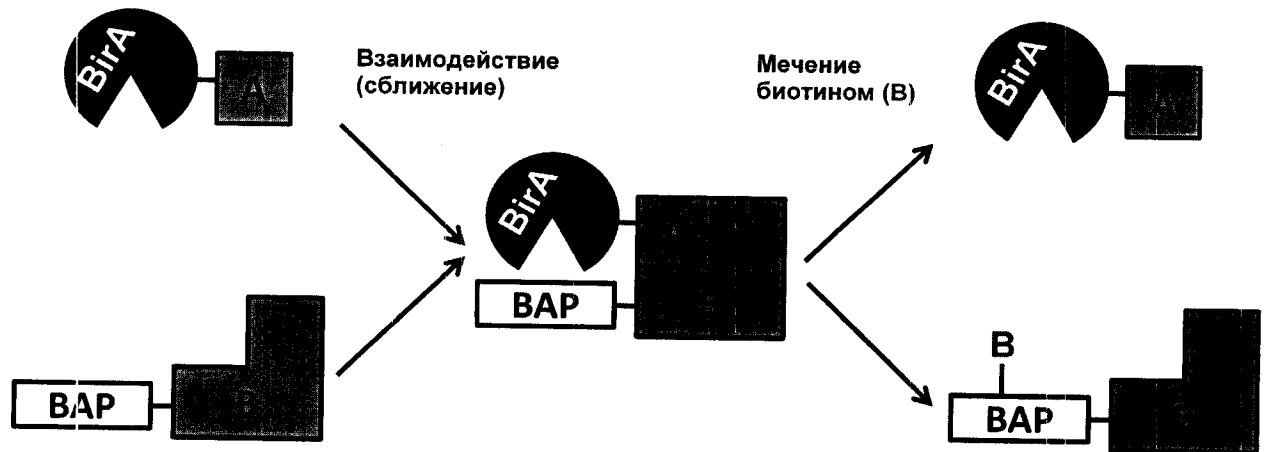


Рисунок 2

**СПОСОБ *IN VIVO* МЕЧЕНИЯ
БЕЛКОВ ПРИ СБЛИЖЕНИИ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТИН
ЛИГАЗЫ BirA И ПЕПТИДОВ
АКЦЕПТОРА БИОТИНА BAP1070
и BAP1108**

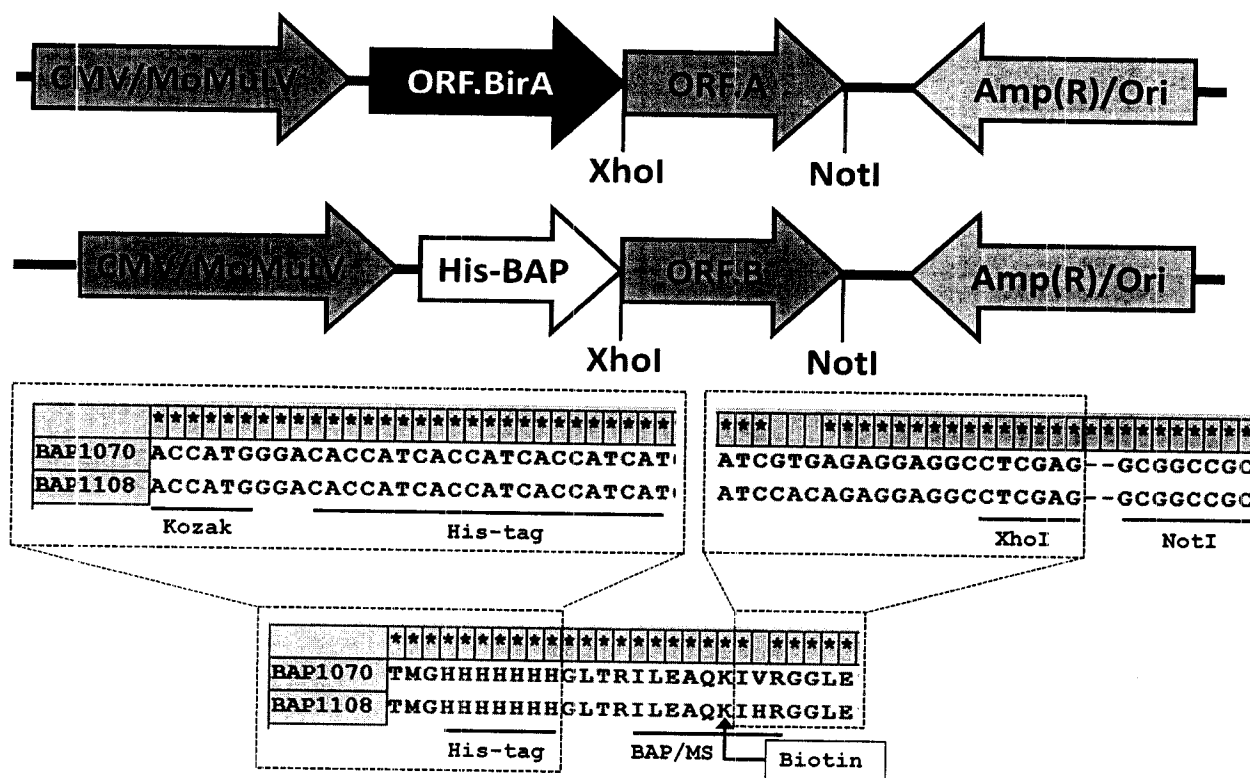


Рисунок 3

СПОСОБ *IN VIVO* МЕЧЕНИЯ БЕЛКОВ ПРИ СБЛИЖЕНИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТИН ЛИГАЗЫ BirA И ПЕПТИДОВ АКЦЕПТОРА БИОТИНА BAP1070 и BAP1108

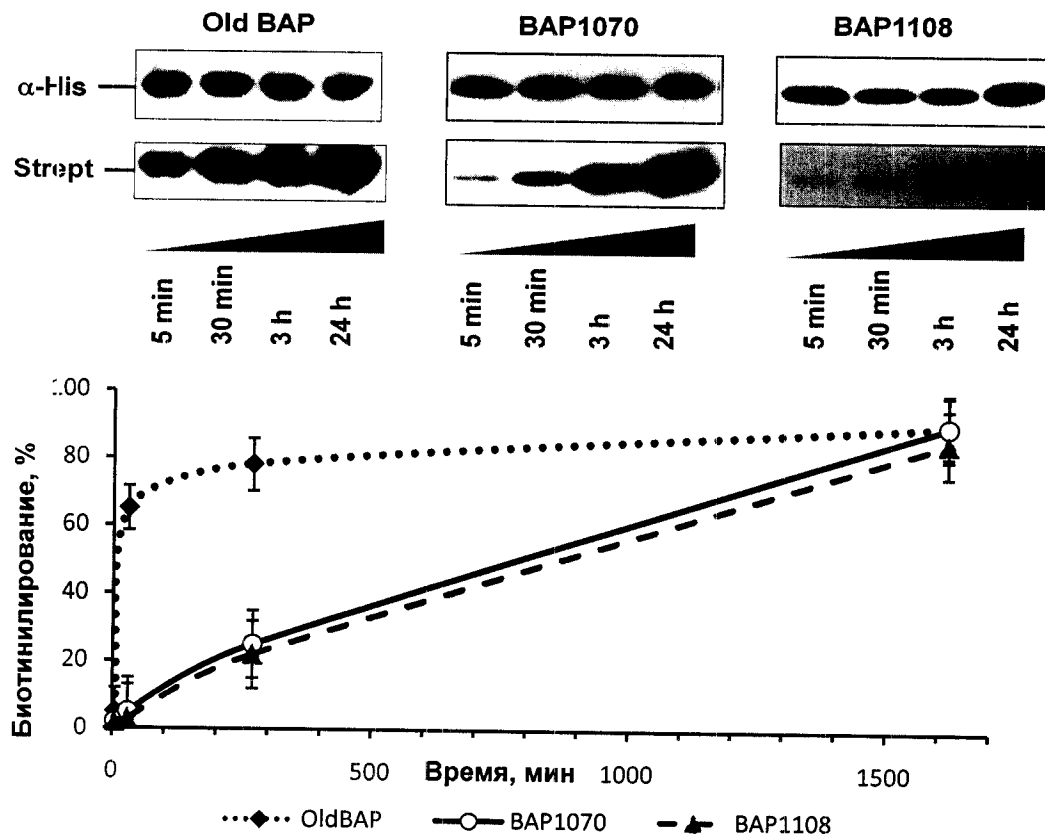


Рисунок 4

**СПОСОБ *IN VIVO* МЕЧЕНИЯ
БЕЛКОВ ПРИ СБЛИЖЕНИИ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТИН
ЛИГАЗЫ BirA И ПЕПТИДОВ
АКЦЕПТОРА БИОТИНА BAP1070
и BAP1108**



Рисунок 5

СПОСОБ *IN VIVO* МЕЧЕНИЯ БЕЛКОВ ПРИ СБЛИЖЕНИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТИН ЛИГАЗЫ BirA И ПЕПТИДОВ АКЦЕПТОРА БИОТИНА VAR1070 и VAR1108

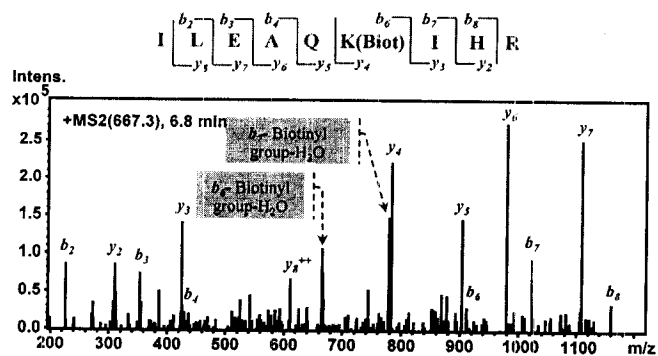
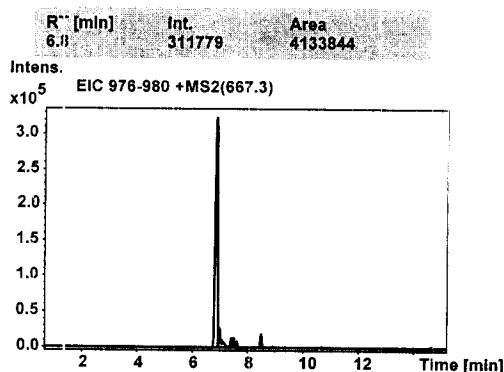
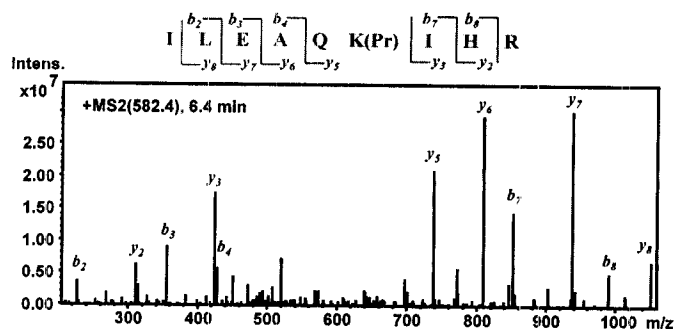
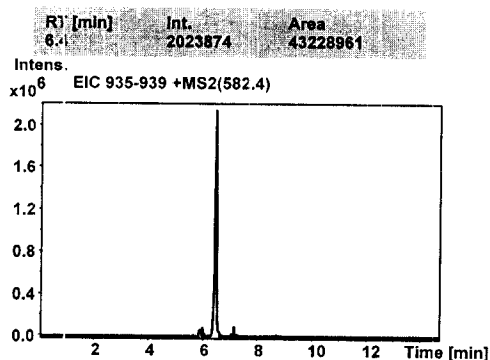
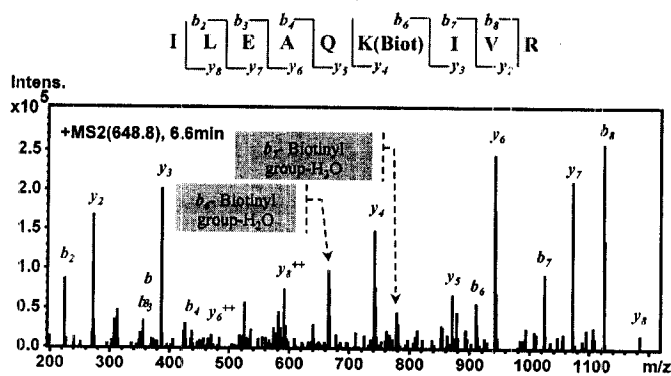
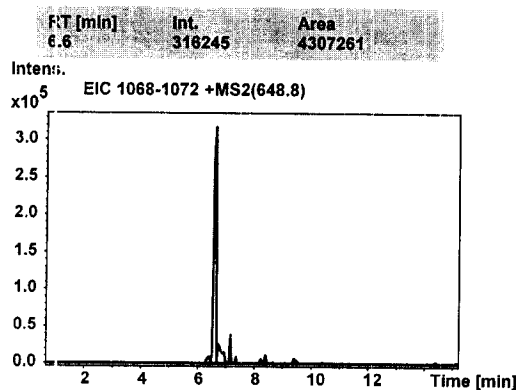
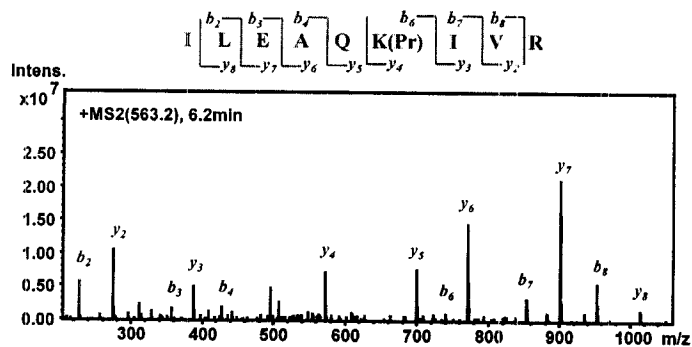
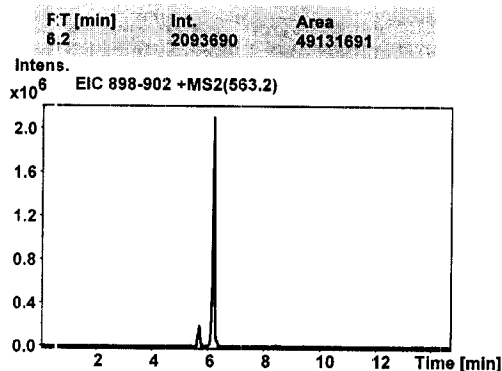


Рисунок 6

**СПОСОБ *IN VIVO* МЕЧЕНИЯ
БЕЛКОВ ПРИ СБЛИЖЕНИИ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТИН
ЛИГАЗЫ BirA И ПЕПТИДОВ
АКЦЕПТОРА БИОТИНА ВАР1070
и ВАР1108**

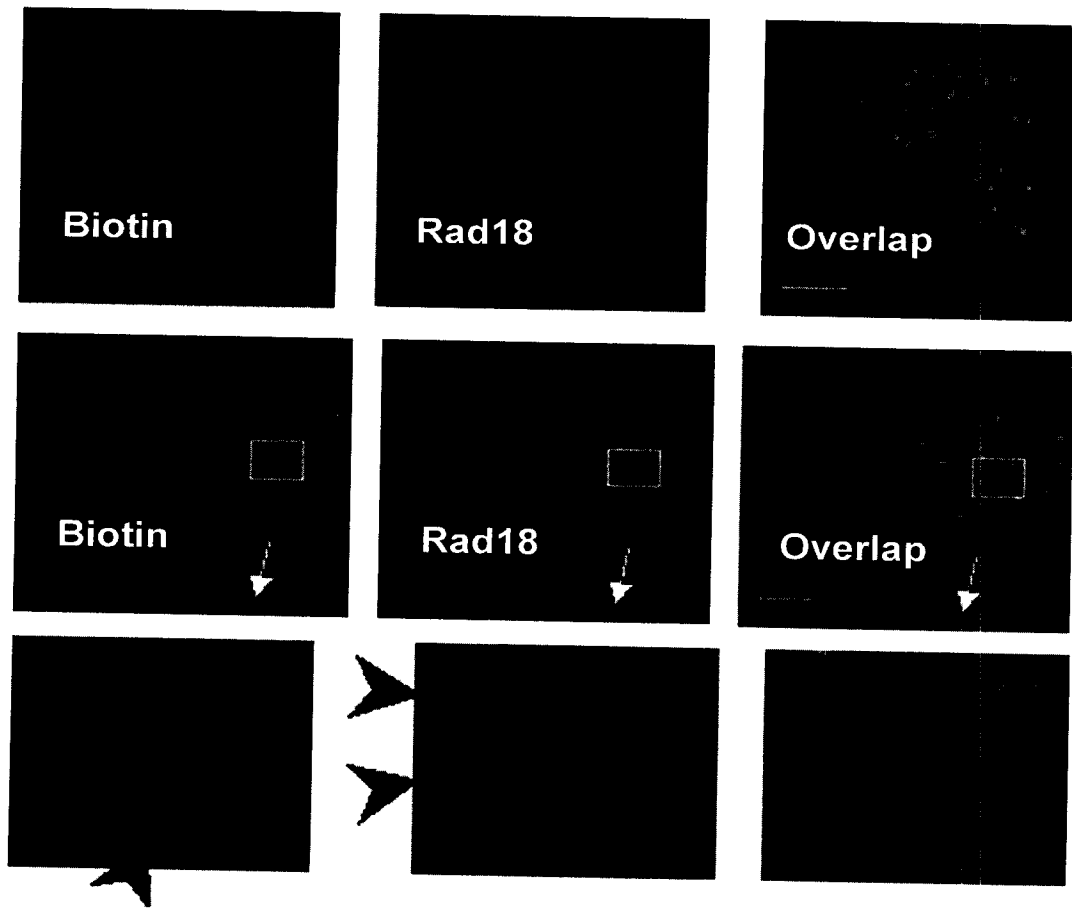


Рисунок 7

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42
Патентной инструкции к ЕАПК)Номер евразийской заявки:
201500724

Дата подачи: 28 мая 2015 (28.05.2015)		Дата испрашиваемого приоритета:	
Название изобретения: Способ <i>in vivo</i> мечення белков при сближении с использованием биотин лигазы BirA и пептидов акцептора биотина ВАР1070 и ВАР1108			
Заявитель: РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ НА ПРАВЕ ХОЗЯЙСТВЕННОГО ВЕДЕНИЯ "НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР БИОТЕХНОЛОГИИ" КОМИТЕТА НАУКИ МИНИСТЕРСТВА ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН			
☐ Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа) ☐ Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)			
А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:		<i>C12Q 1/00</i> (2006.01) <i>C12N 15/11</i> (2006.01) <i>C07K 14/00</i> (2006.01)	
Согласно международной патентной классификации (МПК)			
Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:			
Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК) C12Q 1/00, C07K 14/00			
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска:			
В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ			
Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	
А	KULYYASSOV Arman et al. PUB-MS: A Mass Spectrometry-based Method to Monitor Protein - Protein Proximity in vivo. Journal of proteome research, 2011, 10(10): pp. 4416-4427	1	
А	FERNANDEZ-SUAREZ Marta et al. Protein-Protein Interaction Detection In Vitro and in Cells by Proximity Biotinylation. J Am Chem Soc., 2008. 130 (29):pp. 9251-9253	1	
☐ последующие документы указаны в продолжении графы В ☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении			
* Особые категории ссылочных документов:		"Т" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения "Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности "У" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории "&" документ, являющийся патентом-аналогом "L" документ, приведенный в других целях	
"А" документ, определяющий общий уровень техники			
"Е" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее			
"О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.			
"Р" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета			
"D" документ, приведенный в евразийской заявке			
Дата действительного завершения патентного поиска:		01 апреля 2016 (01.04.2016)	
Наименование и адрес Международного поискового органа: Федеральный институт промышленной собственности РФ, 125993, Москва, Г-59, ГСП-3, Бережковская наб., 30-1. Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА		Уполномоченное лицо :  Т.Ф. Владимирова Телефон № (495) 531-6481	