ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2024, том 60, № 5, с. 552–560

УДК 577.151.45

МЕТОД *in vivo* БИОТИНИЛИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ

© 2024 г. В. Н. Никитин[1], Ю. А. Меркульева[1], Д. Н. Щербаков[1, 2, *]

[1]*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, 630559 Россия*

[2]*Алтайский государственный университет, Барнаул, 656049 Россия*

**e-mail: dnshcherbakov@gmail.com*

Поступила в редакцию 27.10.2024 г.
После доработки 09.03.2024 г.
Принята к публикации 30.04.2024 г.

В работе реализован метод специфического *in vivo* биотинилирования рекомбинантных белков M1 и B7 вируса натуральной оспы при биосинтезе в клетках CHO-K1. Для этого проводили коэкспрессию биотин-лигазы BirA и целевых генов, кодирующих эктодомены белков M1 и B7 с C-концевым avi-tag в клетках CHO-K1 в присутствии биотина в культуральной среде. Оптимальная концентрация биотина для экспрессии белков M1 и B7 составила 125 мкМ. Продукция биотинилированных рекомбинантных белков была осложнена низким выходом. Для повышения продукции целевых белков в культуральную среду добавляли низкомолекулярные энхансеры: лития ацетат, натрия вальпроат и кофеин. Энхансеры увеличивали продукцию целевого белка в 1.3–4.9 раза и не оказывали негативного влияли на выход биотинилированного белка. Наиболее высокий выход биотинилированного белка достигался при одновременном добавлении лития ацетата в концентрации 10 мМ и натрия вальпроата 2.5 мМ. Полученные таким образом белки могут быть использованы для сортировки специфических B-лимфоцитов.

Ключевые слова: рекомбинантные вирусные белки, биотинилирование, биотин-лигаза BirA, пептид акцептор биотина

DOI: 10.31857/S0555109924050132 **EDN:** QSRSAL

Взаимодействие пар молекул, характеризующихся высокой аффинностью и специфичностью, давно и прочно вошли в практику методов изучения молекулярных механизмов биологических процессов. При помощи подобных пар удается изучать белок-белковые взаимодействия, внутриклеточную локализацию белков, а также механизмы специфичного транспорта белков [1–4].

Один из наиболее популярных подходов базируется на взаимодействии пары биотин – (стрепт) авидин. При этом как правило биотин связан с интересующим белком, а (стрепт)авидин выполняет роль носителя метки или иммобилизован на сорбенте.

В настоящее время разработано множество вариаций биотинилирования белков, основанных на химической и ферментативной реакциях легирования молекулы биотина с целевым белком. Химическое биотинилирование часто приводит к образованию гетерогенных продуктов, активность которых может быть ингибирована, или сделать недоступными области связывания белок-лиганд. Химические подходы требуют высокой чистоты целевого белка, а также проведение дополнительной стадии очистки из реакционной смеси, что сопровождается потерей белка на каждой стадии и накладывает дополнительные временные ограничения.

Ферментативные методы подразумевают сайт-специфическое биотинилироване белковых молекул, в состав которых включают последовательности различных пептидов, распознаваемых биотин-лигазами. К настоящему времени накопилась информация о большом количестве вариантов фермента биотинлигазы [5] и пептидных последовательностей акцепторов биотина, называемых AviTag [6]. Одним из наиболее широко используемых, является пептид длиной 15 аминокислотных остатков (-GLNDIFEAQKIEWHE-). Данная последовательность представляет собой специфическую метку, распознаваемую биотин-лигазой BirA *E. coli*, которая присоединяет одну молекулу биотина к одному остатку лизина. Полученный рекомбинантный белок подвергается биотинилированию *in vitro* с использованием очищенного фермента, или *in vivo* в клетках *E. coli*. Реже, такой подход

используют для клеток млекопитающих, в этом случае проводят котрансфекцию плазмидами, кодирующими оба белка, или одной плазмидой в которой находится сразу оба гена [7]. Биотинилирование *in vitro* также требует введение дополнительной стадии диализа и хроматографической очистки целевого белка, что сопровождается потерей белка на каждой операции и временными потерями. Напротив, метод *in vivo* позволяет получить биотинилированные белки непосредственно после хроматографической очистки из культуральной среды.

Практика получения белков, указывает на взаимосвязь посттрансляционных модификаций, которые может обеспечить выбранная система экспрессии, его фолдингом и функциональной активностью [8]. Преобладающая, сегодня, практика использования клеточной линии CHO-K1, известные клеточные механизмы посттрансляционной модификации, а также накопленные знания по модификации и условиям культивирования, делают данную линию удобным инструментом для наработки белков [9, 10]. Получение некоторых белков в клетках млекопитающих сталкивается с рядом сложностей, связанных с низким выходом, для решения которых известны различные генно-инженерные и селекционные подходы [11, 12]. Особые сложности вызывают белки вирусного происхождения, уровень продукции которых, в неоптимизированной системе не превышал 0.5–1.5 мг/л [13], для решения которых часто прибегают к использованию других систем экспрессии [14, 15]. Подобные белки имеют свойство угнетать метаболическую активность клеток, или распознаются цитоплазматическими сенсорами как чужеродные элементы и подвергаются деградации [16, 17]. Как показано, в случае получения гликопротеина NS1 Zika, в клетках HEK, не превышают 10 мг/л в оптимизированной системе продукции с добавление энхансеров, при этом продукция была увеличена в 39 раз [8]. Другим, не менее эффективным способом повышения продукции целевого белка является добавление в культуральную среду веществ-энхансеров, которые, например, останавливают клеточный цикл на стадиях G2 или G1 [18], делают ДНК более доступной [19, 20] повышают проницаемость клеточных мембран, хотя для некоторых энхансеров механизмы действия не установлены, они длительное время используются, как стратегия повышения продукции белков [18]. С этой целью успешно применяются следующие соединения: кофеин, ацетат лития, вальпроат натрия, цитрат железа и бутират натрия и другие [21, 22].

Цель работы – разработка метода получения биотинилированных рекомбинантных вирусных белков в клетках линии CHO-K1, а также исследование влияния энхансеров ацетата лития, вольпрата натрия, кофеина и их комбинаций на продукцию биотинилированных белков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн плазмидных векторов. Векторы для получения *in vivo* биотинилированных рекомбинантных белков конструировали с использованием оригинальных векторов экспрессии pVEAL [23] и pVEAL2 [24], использующих систему интеграции транспозазы Sleeping Beauty. Плазмидные векторы pVEAL2-M1 и pVEAL2-B7 получали встройкой фрагментов генов, кодирующих эктодомены белков M1 и B7 натуральной оспы по сайтам рестрикции AsuNHI и SalI с использованием соответствующих ферментов (“Сибэнзайм”, Россия). Обратные праймеры содержали последовательности, кодирующие his-tag и avi-tag для введения в C-конец генов M1R и B7R. Плазмидный вектор pVEAL-BirA получали путем встройки нуклеотидной последовательности BirA по сайтам рестрикции AsuNHI и Zsp2I с использованием соотвествующих ферментов (“Сибэнзайм”, Россия). Нуклеотидные последовательности целевых генов и праймеров для амплификации генов M1R и B7R были синтезированы в коммерческой научно-производственной организации (“ДНК-Синтез”, Россия). Праймеры (табл. 1) были рассчитаны с помощью программы SnapGene 3.2.1.

Нуклеотидные последовательности полученных плазмидных конструкций анализировали при помощи метода секвенирования по Сенгеру.

Получение стабильных клеточных линий CHO-BirA-M1 и CHO-BirA-B7. Стабильные продуценты рекомбинантных вирусных белков M1 и B7 получали путем трансфекции клеток

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры использованные для амплификации генов M1 и B7 натуральной оспы

Ген	Праймер	Последовательность олигонуклеотидного праймера (5'–3')
M1	M1R_Afe_F	gctggccgcaagcatacagacgacggtga
	A30L_His_R	CCGTGGTGATGGTGGTGATGctgaactcctgtaccagcaact
B7	B7R_Afe_F	gctggccacatgtactgtacccactatgaataac
	B7R_Avi_R	tttttGCGGCCGCattaTTCATGCCACTCGATCTTCTGAGCCTCGAAGATGTCGTT CAGGCCGTGGTGATGGTGGTGATGatgataagttgcttctaacgattctatttct

целевыми плазмидами с использованием реагента Lipofectamine 3000 (“Invitrogen”, США) [25]. Клеточную линию CHO-K1 выращивали до 90% конфлюэнтности в среде DMEM F12 (“Invitrogen”, США) содержащей 10% FBS (“Invitrogen”, США), затем среду меняли на бессывороточную и котрансфицировали плазмидными конструкциями pVEAL2-M1 и pVEAL-BirA или pVEAL2-B7 и pVEAL-BirA, для интеграции экспрессионных кассет векторов в геном клеток также добавляли плазмиду pSB100X, кодирующую транспозазу Sleeping Beauty в соотношении 1/12 по массе. Заменяли среду на свежую с 2% FBS (“Invitrogen”, США) и проводили селекцию с использованием двух антибиотиков zeocin и puromicine (“Thermo Fisher Scientific”, США). Для контроля селекции использовали клеточную линию, не содержащую вставки.

Оценка жизнеспособности клеток при культивировании в присутствии биотина в МТТ-тесте. Оценку токсической концентрации биотина устанавливали методом МТТ-теста [26]. В каждую лунку плоскодонного 96-луночного планшета вносили клетки CHO-BirA и CHO-K1 и инкубировали до 90% конфлюэнтности в полной ростовой среде DMEM/F-12 с 10% FBS. Затем среду меняли на свежую содержащую 2% FBS. К клеткам добавляли раствор биотина в различных концентрациях от 2 до 0.015 мМ в ДМСО и инкубировали 3 сут. В контрольные лунки добавляли ДМСО. Среду отбирали, лунки промывали раствором PBS, добавляли по 100 мкл раствора МТТ (“Диаэм”, Россия) с концентрацией 1 мг/мл и инкубировали 2.5 ч при 37°C. По истечении этого времени раствор МТТ заменяли раствором ДМСО и инкубировали клетки при комнатной температуре. В каждой лунке измеряли оптическую плотность (**ОП**) при 490 нм (с учетом фонового поглощения на 655 нм). МТТ-тест проводили в трех повторностях. ОП каждого образца измеряли 3 раза.

Культивирование клеток продуцентов. Наработку целевого белка проводили при адгезионном культивировании, во всех случаях клетки-продуценты культивировали 5 сут [27]. Клеточные линии CHO-BirA-M1 и CHO-BirA-B7 подращивали до 90% конфлюэнтности в среде DMEM F12 с содержанием 10% FBS. Затем среду заменяли на поддерживающую, содержащую 2% FBS, и вносили различные концентрации биотина и низкомолекулярных энхансеров продукции. Для оптимизации условий получения биотинилированных белков, клеточные линии рассевали в 24-луночные планшеты и культивировали в присутствии биотина в концентрации от 0.031 до 2 мкМ. Для оценки влияния энхансеров на продукцию белка и степень биотинилирования клеточные линии культивировали в 24-луночных планшетах в присутствии единичных энхансеров ацетата лития, вальпроата натрия и кофеина или их комбинации. Наработку белка проводили в T25 культуральных матрасах. Собранную культуральную среду диализовали против базового буфера содержащего 0.2 М Na_2HPO_4, 0.5 М NaCl и 0.02 М имидазола, добавляли консервант NaN_3 и хранили при 4°C до следующей стадии очистки.

Хроматографическая очистка белков. Целевой белок очищали методом металл-аффинной хроматографии (**IMAC**) на сорбенте Ni^{2+}NTA HisTrap FF (“GE Healthcare”, США). Образец наносили на колонку, уравновешенную базовым буфером, промывали и элюировали в градиенте концентрации имидазола 20 мМ – 300 мМ. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли, диализовали против 0.1%-ного PBS и хранили при 4°C.

Для очистки биотинилированного белка использовали сорбент стрептавидин-сефароза HP (“GE Healthcare”, США). К 200 мкл смолы добавляли к 500 мкл очищенного лизата и помещали в шейкер на 4 ч при 4°C. После инкубации сорбент трижды промывали 0.1%-ным PBS, после чего смолу осаждали при 2000 g в течение 5 мин. Этап элюирования проводился в течение ночи добавлением 300 мкл буфера, содержащего 5 мМ биотина, после чего раствор диализовали против 0.1%-ного PBS.

Концентрацию очищенных белков измеряли спектрофотометрическим методом с использованием коэффициентов молярной экстинкции 45380 М-1см$^{-1}$ для B7, 12950 М$^{-1}$см$^{-1}$ для M1 при 280 нм, и 338357 М$^{-1}$см−1 для B7, 620890 М$^{-1}$см$^{-1}$ для M1 это все в индексе должно быть при 214 нм. Введение биотина в белковые молекулы не вносит значительного вклада в кривую поглощения на длине волны 280 нм [28]. Измерения спектров поглощения каждого образца проводили в 3 повторностях.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Относительное содержание белков B7 и M1 определяли методом сендвич-ИФА с использованием рекомбинантных scFv моноклональных антител 283 и M12B9 [29, 30]. Антитела вносили в лунки 96-луночных планшетов и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, и блокировали раствором 1%-ного казеина в PBS. Затем вносили последовательные разведения исследуемых белков и инкубировали 1 ч при 37°C. Далее, добавляли мышиные моноклональные антитела специфичные в отношении 6×His конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) (ab1187, “Abcam”, США). Анализ биотинилированных рекомбинантных белков проводили по аналогичной схеме с внесением, на последней стадии стрептавидин-HRP (“Invitrogen”, США). Между каждым этапом планшеты трижды промывали раствором 0.1%-ного Tween-20 в PBS. Использование конъюгатов проводили в соответствии с инструкциями производителя. Реакцию проявляли с помощью реагента 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (“Sigma”, США) и детектировали сигнал на длине волны 450 нм. Измерения оптической плотности каждого образца проводили в 3 повторностях.

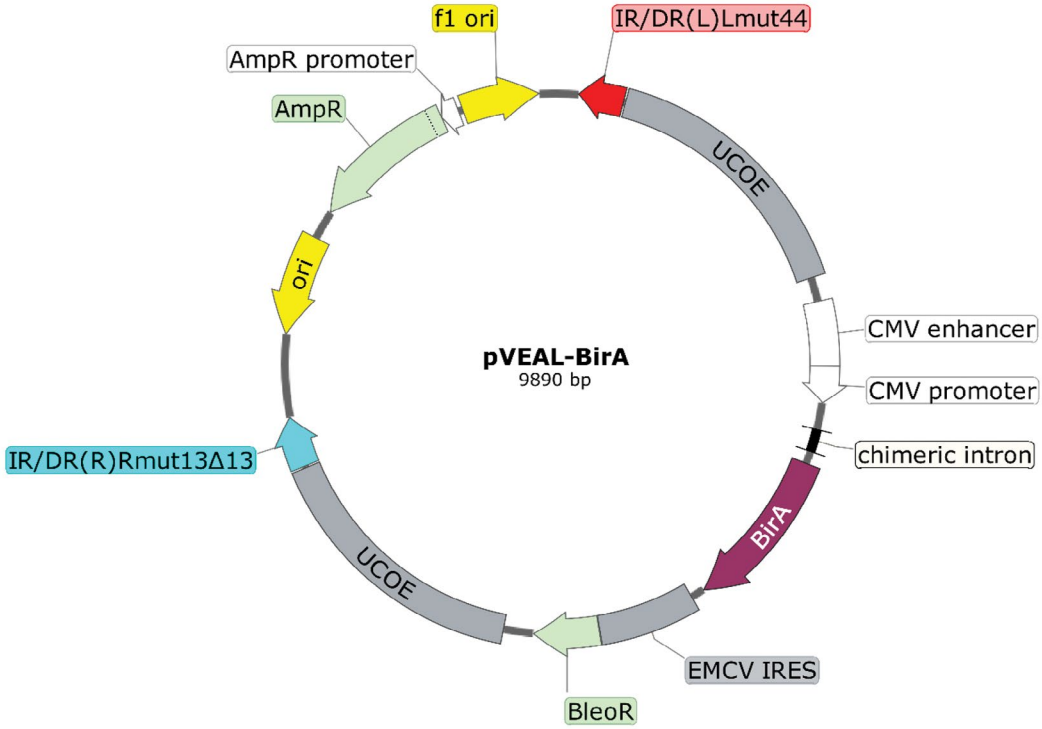
Электрофоретический анализ и вестерн-блот. Образцы анализировали в 15%-ном ПААГ с Na-ДДС

в восстанавливающих условиях в трис-глициновом буфере. После электрофореза гель переносили на мембрану PVDF (“Millipore”, США). Мембрану блокировали 5%-ным казеином в растворе PBS, промывали PBST и инкубировали с соответствующими антителами. Наличие белка, определяли с помощью вестерн-блот анализа с использованием мышиных anti-6×His антител коньюгированных с щелочной фосфатазой AP при окрашивании мембраны с помощью раствора BCIP(5-бром-4-хлор-3-индолил фосфат)/NBT (нитротетразолий синий). Относительное количество биотинилированного белка определяли с использованием одновалентного стрептавидина коньюгированного с HRP (“Invitrogen”, США) при окрашивании хемилюминисцентным субстратом ECL. Детекцию сигнала ECL проводили с помощью гель-документирующей системы iBright (“Thermo Fisher Scientific”, США) в режиме ChemiBlot.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение продуцентов белков M1 и B7. (табл. 2). Для получения стабильных продуцентов была выбрана система интеграции в геном с использованием транспозона Sleeping Beauty. Плазмидные векторы pVEAL-BirA, pVEAL2-M1 и pVEAL2-B7 сконструированы по общей схеме для векторов, интегрируемых транспозазой Sleeping Beauty и содержат кассету экспрессии, ограниченную плечами интеграции IR/DR [31]. Кассета экспрессии содержит энхансер и промотор CMV, внутренний сайт посадки рибосомы IRES, целевой ген и ген устойчивости к антибиотику Zeocin (pVEAL) или Puromicine (pVEAL2) (рис. 1). Так как нашей целью является наработка секретируемых белков, было необходимо направить трансляцию всех белков в один компартмент [32]. Для колокализации биотин-лигазы и целевых белков в N-конец гена BirA была ведена последовательность, кодирующая сигнальный лидерный пептид

(а)



(б)

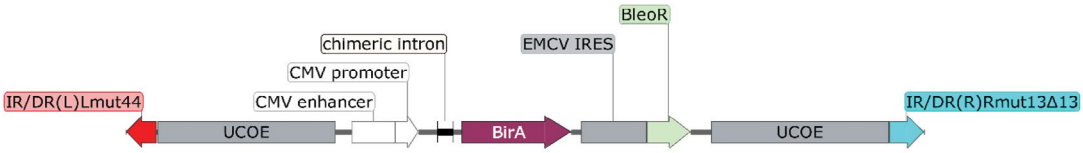


Рис. 1. Карта плазмидного вектора pVEAL-BirA (а) и последовательность кассеты экспрессии гена BirA (б).

KDLT, чтобы обеспечить транслокацию фермента в ЭПР (рис. 1). Секреция целевых белков обеспечивалась сигнальной последовательностью V19 MMRPIVLVLLFATSALA, введенной в N-конец [33]. Для специфического мечения, детекции и очистки белков, в С-концевую последовательность белков были введены последовательности avi-tag GLNDIFEAQKIEWHE и 6×his-tag (рис. 2).

Для продукции рекомбинантных вирусных белков клеточную линию CHO-K1 ко-трансфицировали тремя генетическими конструкциями, кодирующими биотин-лигазу BirA белки M1 или B7, и вектором для кратковременной продукции транспозазы SB100X Sleeping Beauty. Предварительную оценку продукции целевых белков проводили методом ИФА со специфическими антителами к M1 и B7. Высокий уровень сигнала был выявлен только в лунках с белками, инкубированными со специфическими антителами, внесение неспецифических моноклональных антител и сывороток показало фоновые значения сигнала. Анализ целевых белков был осложнен стабильно низкой продукцией. Для подтверждения специфичности биотинилирования вирусных белков M1 и B7 культуральную среду анализировали при помощи вестерн-блот анализа. Как видно из рис. 3 и 4, биотинилирование протекало высокоспецифично по отношению к целевым белкам и только в присутствии экзогенного биотина в культуральной среде.

Продукция биотинилированных рекомбинантных белков M1 и B7 вируса натуральной оспы. *In vivo* биотилинилирование белков в клетках прокариот (*E. coli*) протекало при конечной концентрации биотина 50 - 100 мкМ [34]. Для *in vivo* биотинилирования белков в экспрессионной системе клеток млекопитающих, как правило используются концентрации биотина в диапазоне 100–200 мкМ [35, 36]. При оптимизации условий биотинилирования белков в клетках млекопитающих был выбран диапазон концентраций от 2 до 0.015 мкМ и была определена максимальная концентрация биотина,

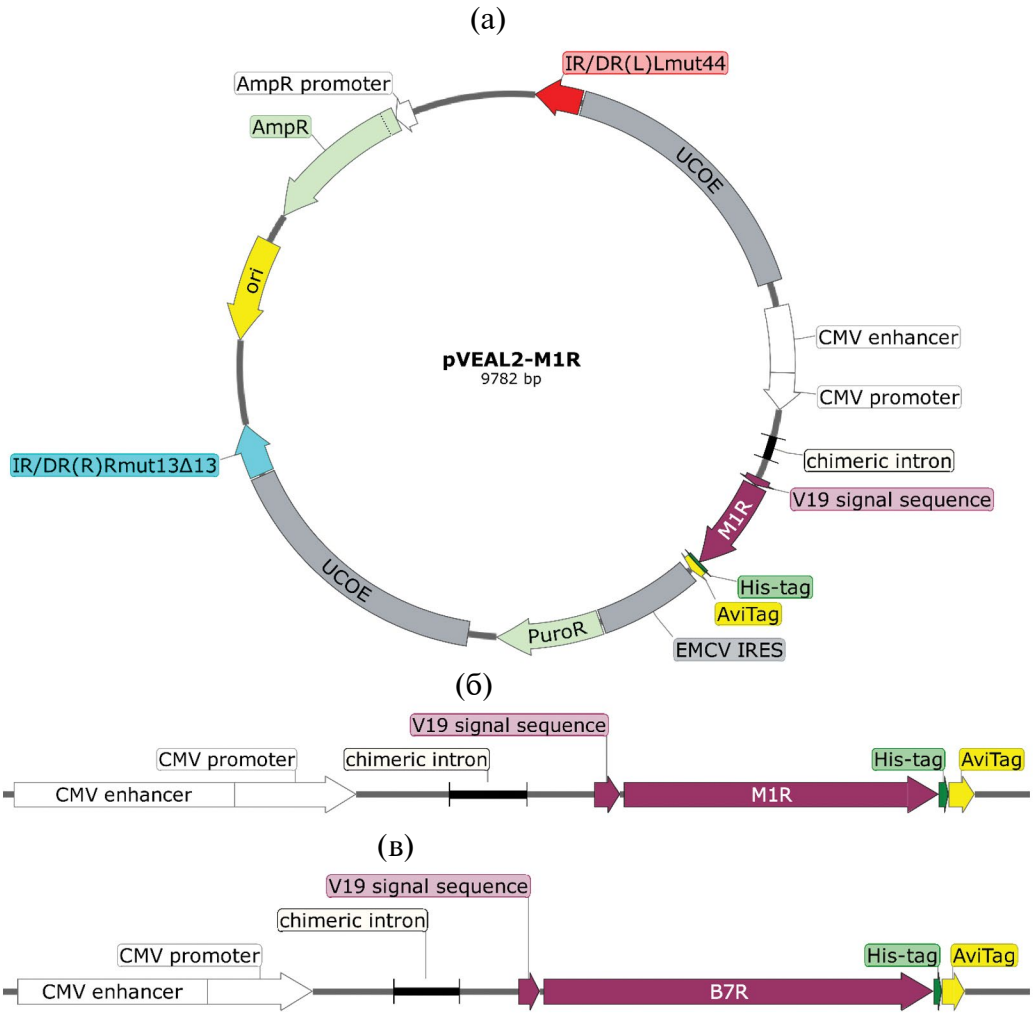


Рис. 2. Карта плазмидного вектора pVEAL2 (а) и генов M1R (б) и B7R (в), содержащих сигнальный пептид секреции, метки his-tag и avi-tag.

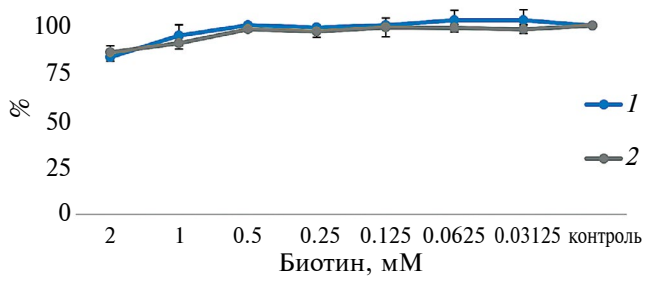


Рис. 3. Жизнеспособность клеток CHO-K1 (*1*) и CHO-BirA (*2*) при культивировании в присутствии различных концентраций биотина.

не оказывающая токсического действия на контрольную клеточную культуру CHO-K1 и клеточную линию, продуцирующую CHO-K1-BirA. Негативного влияния на метаболическую активность клеток не наблюдалось при концентрации биотина вплоть до 0.5 мкМ (рис. 3). Определение концентрации биотина, обеспечивающей максимально возможный уровень биотинилирования проводили на клеточной линии CHO-BirA-B7. В оценке использовали весь диапазон концентраций, с учетом тех, которые выходят за порог токсического действия. Независимо от времени наработки оптимальной была концентрация биотина 0.125 мкМ (рис. 5). Так же при концентрации биотина 2.0 и 1.0 мкМ не наблюдалось снижения уровня сигнала белка, несмотря на достижение уровня токсичной концентрации.

Использование низкомолекулярных энхансеров для повышения продукции белков M1 и B7. Независимо от времени культивирования и метода трансфекции клеток, клеточная линия CHO-K1 показывала выход целевого белка, после стадий очистки и диализа, не более 0.9 мг/л для B7 и 0.65 мг/л для M1. Для повышения продукции целевых белков были протестированы три наиболее доступных энхансера, с различными механизмами действия: кофеин, ацетат лития и вальпроат натрия.

Вальпроевая кислота ингибирует активность гистондеацетиллазы, усиливая экспрессию генов в стабильных культурах, также увеличивает выход белка и при транзиентной экспрессии, механизм действия этого процесса не до конца понятен, известны некоторые аспекты взаимодействия с клеточными факторами [37]. Было показано, что вальпроевая кислота увеличивает уровень шаперонов в ЭПР, таких как GRP78, GRP94, HSP47, протеин-дисульфид-изомеразы, HSP70. Также было обнаружено, что вальпроевая кислота влияла как на киназу, регулируемую внеклеточными сигналами (**ERK**), протеинкиназу C (**PKC**), так и на пути Wnt/β-катенин, регулируя дифференцировку и пролиферацию различных клеток [38].

Механизм действия кофеина описан как ингибирование нескольких киназ, в том числе ATM (мутированная атаксия-телеангиэктазия), ATR (атаксия-телеангиэктазия и Rad3-родственный белок) и DNA-PKcs (каталитическая субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы), которые являются важными сигнальными белками, участвующими в репарации двухцепочечных разрывов ДНК. Показано, что при миллимолярных концентрациях кофеин действует как ингибитор фосфодиэстеразы, что потенциально приводит к повышению уровня цАМФ и усилению экспрессии с промотора/энхансера CMV, который содержит элементы ответа цАМФ. Транскриптомные данные указывают на другой потенциальный механизм, с помощью которого кофеин может усиливать транскрипцию за счет подавления синтеза ингибитора транскрипции Eid3 [39]. Ацетат лития оказывает влияние на

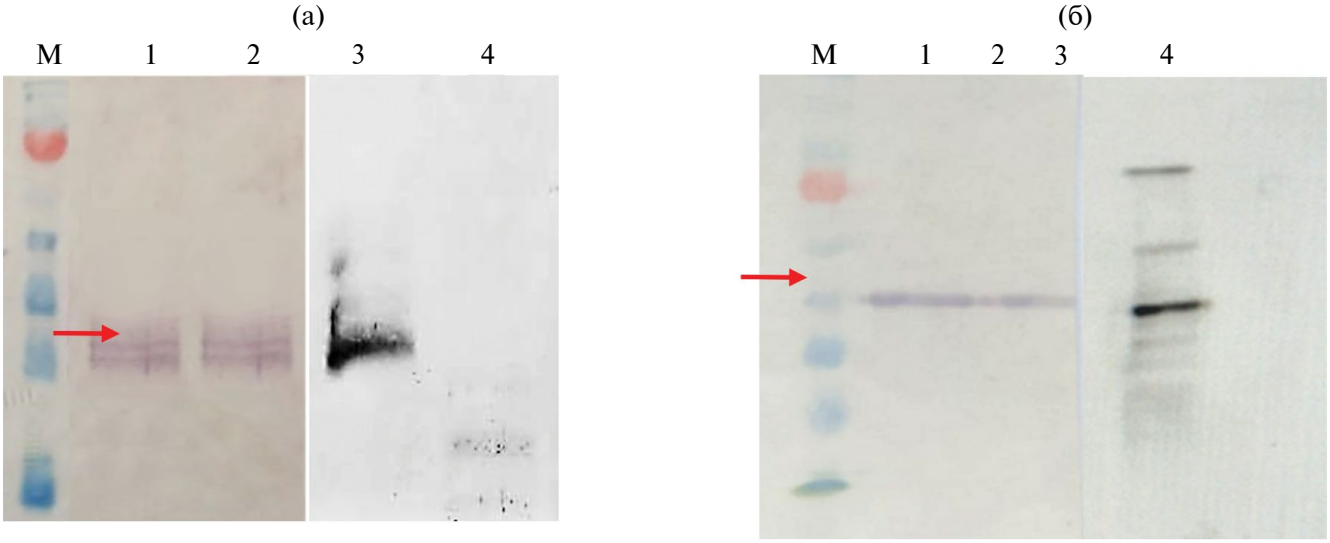


Рис. 4. Вестрен-блот анализ биотинилированных белков: M1 (а) и B7 (б), 1, 3 – выделенных из культуральной среды с добавлением экзогенного биотина, 2, 4 – из культуральной среды без биотина, M – маркер.

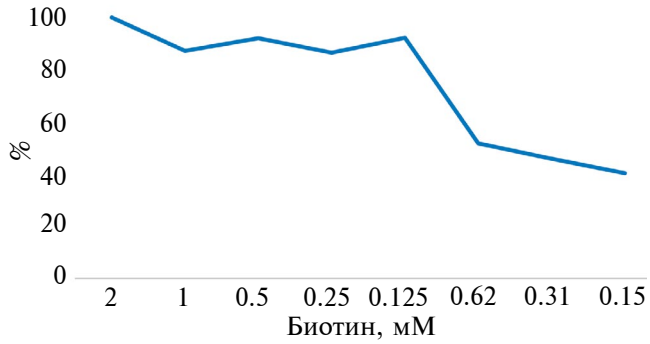


Рис. 5. Уровень биотинилирования (%) белка B7 вируса натуральной оспы в зависимости от концентрации биотина в культуральной среде. Представлены значения, нормализованные по максимальной оптической плотности.

текучесть мембраны, индуцирует остановку клеток в фазе G2/M и является негативным регулятором апоптоза [22].

Оценку действия энхансеров проводили методом сендвич-ИФА, при этом аликвоты отбирали непосредственно из культуральной среды. Добавление каждого из энхансеров приводило к увеличению сигнала поглощения ОП в среднем в 2.5–3.0 раза для B7 и 1.3–1.8 раза для M1 (рис. 6). Кофеин оказывал наименьший положительный эффект ~ 1.1 и был исключен из дальнейших исследований. При внесении комбинации препаратов вальпроата натрия и ацетата лития в максимальных концентрациях, сигнал ИФА был максимальным. Оценку абсолютного значения концентрации каждого из белков, которые по результатам теста ИФА показали лучший результат, проводили методом УФ спектроскопии. Клеточная линия

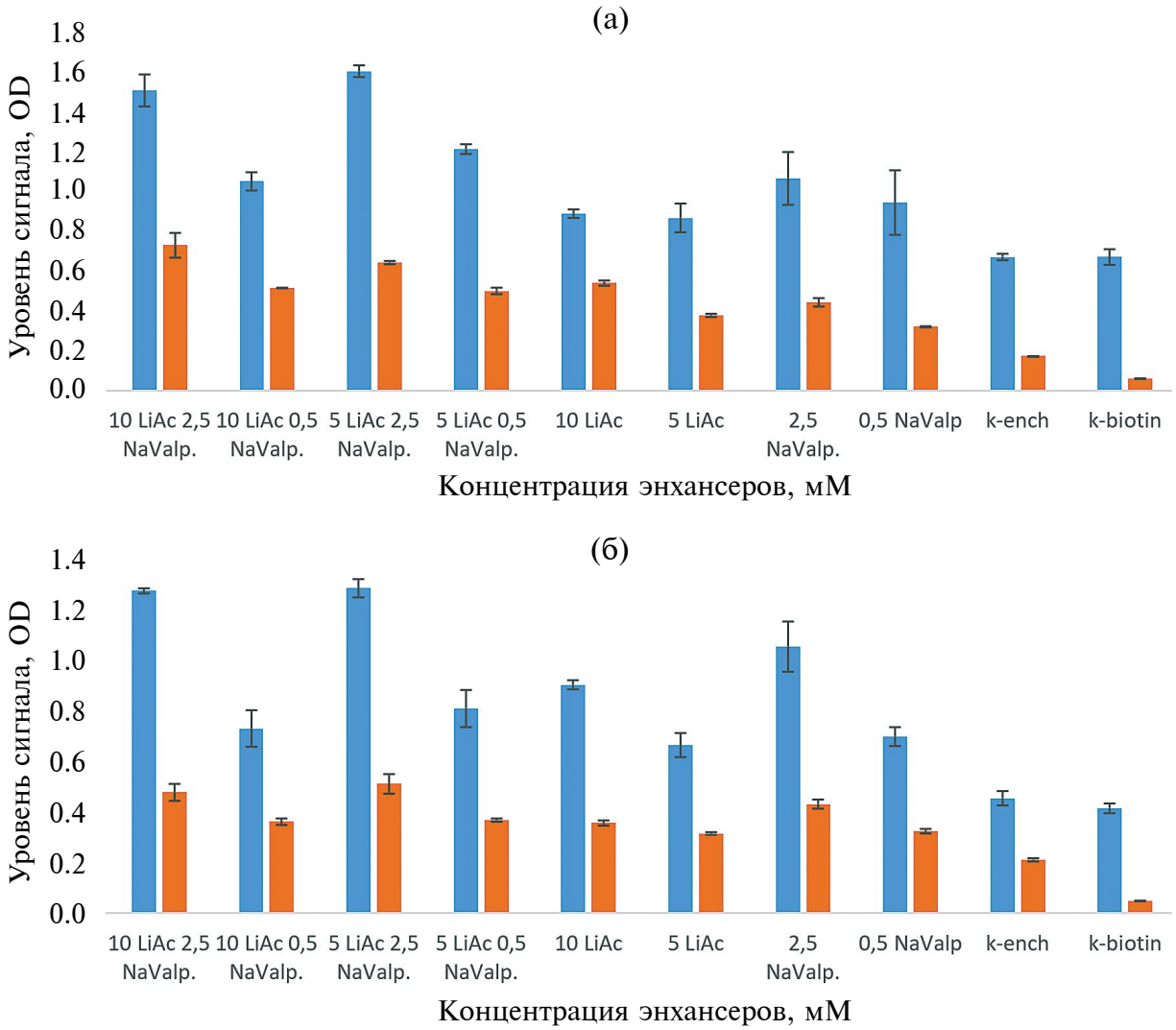


Рис. 6. Количество общего и биотинилированного рекомбинантного белка B7 (а) и M1 (б) вируса натуральной оспы в культуральной среде, в зависимости от концентрации энхансеров в среде.

CHO-BirA-M1 продуцировала меньшее количество общего белка – 1.5 мг/л, по сравнению с 4.5 мг/л для CHO-BirA-B7, и меньше реагировала на присутствие энхансеров в ростовой среде, независимо от их концентрации. Не зависимо от концентрации и комбинации внесенных энхансеров не наблюдалось негативного влияния на биотинилирование целевого белка. При оценке продукции биотинилированного белка в присутствии энхансеров и без них наблюдали прямую зависимость между увеличением абсолютного значения общего и биотинилрованного белка. Количество биотинилированного белка в условиях ведения клеточных линий на среде, содержащей комбинацию энхансеров в максимальной концентрации, составило 2.03 мг/л для B7 и 0.23 мг/л для M1. Без добавления энхансеров выход белка, при аналогичных условиях культивирования составил 0.29 для B7 и 0.1 мг/л для M1. Таким образом, при добавлении энхансеров к клеткам CHO-BirA-B7 наблюдалось повышение выхода биотинилированного белка с 32 до 45%, однако, в случае с клеточной линией, продуцирующей белок M1, процент выхода оставался постоянным и составлял 35%.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mendoza-Topaz C.* // Methods Mol. Biol. 2020. V. 2169. P. 89–103.
2. *Habel J.E.* // Methods Mol. Biol. 2021. V. 2261. P. 357–379.
3. *Suzuki Y., Kadomatsu K., Sakamoto K.* // The Journal of Biochemistry. 2023. V. 173. № 6. P. 413–415. https://doi.org/10.1093/jb/mvad013
4. *De Boer E., Rodriguez P., Bonte E., Krijgsveldt J., Katsantoni E., Heckt A. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2003. V. 100. № 13. P. 7480–7485.
5. *Kido K., Yamanaka S., Nakano S., Motani K., Shinohara S., Nozawa A., et al.* // Elife. 2020. V. 9. https://doi.org/10.7554/eLife.54983
6. *Kulyyassov A., Ramankulov Y., Ogryzko V.* // Life. 2022. V. 12. № 2. P. 300. https://doi.org/10.3390/life12020300
7. *Wang Q., Wagner R.T., Cooney A.J.* // PLoS One. 2013. V. 8. № 5. P. e63532. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063532
8. *Roldán J.S., Cassola A., Castillo D.S.* // Biotechnology Reports. 2020. V. 25. p. e00434. https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00434
9. *Rahimi A., Karimipoor M., Mahdian R., Alipour A., Hosseini S., Mohammadi M. et al.* // *Iran J. Biotechnol.* 2023. V. 21. № 2. e3388. https://doi.org/10.30498/ijb.2023.343428.3388
10. *Ghaderi D., Zhang M., Hurtado-Ziola N., Varki A.* // Biotechnology & Genetic Engineering Reviews. 2013. V. 28. P. 147–176.
11. *Y ang W., Zhang J., Xiao Y., Li W., Wang T.* // Front. Bioeng. Biotechnol. 2022. V. 10. P. 858478. https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.858478
12. *Bhatwa A., Wang W., Hassan Y.I., Abraham N., Li X.Z., Zhou T.*// Front. Bioeng. Biotechnol. 2021. V 9. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.630551
13. *Stuible M., Gervais C., Lord-Dufour S., Perret S., L'Abbé D., Schrag J. et al.* // J. Biotechnol. 2021. V. 326. P. 21–27.
14. *Kusakabe T.* // J. Pharmacol. Sci. 2023. V. 151. № 3. P. 156–161.
15. *Thoring L., Dondapati S.K., Stech M., Wüstenhagen D.A., Kubick S.* // Scientific Reports. 2017. V. 7. № 1. P. 1–15.
16. *Iwasaki A.* // Annu Rev Microbiol. 2012. V. 66. P. 177–196.
17. *Mojzesz M., Rakus K., Chadzinska M., Nakagami K., Biswas G., Sakai M. et al.* // Int. J. Mol. Sciences. 2020. V. 21. № 19. P. 7289. https://doi.org/10.3390/ijms21197289
18. *Ha T.K., Kim Y.G., Lee G.M.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 98. № 22. P. 9239–9248.
19. *Yang W.C., Lu J., Nguyen N.B., Zhang A., Healy N.V., Kshirsagar R. et al.* // Mol Biotechnol. 2014. V. 56. № 5. P. 421–428.
20. *Backliwal G., Hildinger M., Kuettel I., Delegrange F., Hacker D.L., Wurm F.M.* // Biotechnol Bioeng. 2008. V. 101. № 1. P. 182–189.
21. *Avello V., Torres M., Vergara M., Berrios J., Valdez-Cruz N.A., Acevedo C. et al.* // PLoS One. 2022. V. 17. № 11. P. e0277620. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0277620
22. *Ha T.K., Kim D., Kim C.L., Grav L.M., Lee G. M.* // Biotechnol Adv. 2022. V 54. P. 107831. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107831
23. Патент Россия. 2020. RU2749459C1.
24. Патент Россия. 2021. RU2752858C1.
25. *Dobson L.J., Saunderson S.C., Smith-Bell S.W.J., McLellan A.D.* // Immunol Cell Biol. 2023. V 101. № 9. P. 847–856.
26. *Kupcsik L.* // Methods Mol Biol. 2011. V. 740. P. 13–19.
27. *YekrangSafakar A., Mehrnezhad A., Wu T., Park K.* // Biotechnol Bioeng. 2022. V. 119. № 6. P. 1498–1508.

28. *Hou X., Wei W., Fan Y., Zhang J., Zhu N., Hong H. et al.* // Appl Microbiol Biotechnol. 2017. V. 101. № 13. P. 5259–5266.
29. *Gilchuk I., Gilchuk P., Sapparapu G., Lampley R., Singh V., Kose N. et al.* // Cell. V. 167. № 3. P. 684–694.
30. *Kaever T., Meng X., Matho M. H., Schlossman A., Li S., Sela-Culang I. et al.* // J Virol. 2014. V. 88. № 19. P. 11339–11355.
31. *Ivics Z., Hackett P.B., Plasterk R.H., Izsvák Z.* // Cell. 1997. V. 91. № 4. P. 501–510.
32. *Niers J.M., Chen J.W., Weissleder R., Tannous B.A.* // Anal Chem. 2011. V. 83. № 3. P. 994–999.
33. Патент США. 2008. US8241870B2.
34. *Gräslund S., Savitsky P., Müller-Knapp S.* // Methods Mol. Biol. 2017. V. 1586. P. 337–344.
35. *Petris G., Vecchi L., Bestagno M., Burrone O.R.* // PLoS One. 2011. V. 6. № 8. P. e23712. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023712.
36. *Predonzani A., Arnoldi F., López-Requena A., Burrone O.R.* // BMC Biotechnol. 2008. V. 8. P. 41. https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-41.
37. *Rubiyana Y., Damajanti Soejoedono R., Santoso A.* // Indonesian Journal of Biotechnology. 2020. V. 25. № 1. P. 28. https://doi.org/10.22146/ijbiotech.52621.
38. *Wulhfard S., Baldi L., Hacker D.L., Wurm F.* // Biotechnol. 2010. V. 148. № 2–3. P. 128–132.
39. *Fomina-Yadlin D., Mujacic M., Maggiora K., Quesnell G., Saleem R., McGrew J.T.* // J. Biotechnol. 2015. V. 212. P. 106–115.

In vivo Method for Biotinylation of Recombinant Variola Virus Proteins

V. N. Nikitin[a], Yu. A. Merkuleva[a], and D. N. Shcherbakov[a, b, *]

[a]*State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, Koltsovo, 630559 Russia*
[b]*Altai State University, Barnaul, 656049 Russia*
**e-mail: dnshcherbakov@gmail.com*

The work implements a method for specific in vivo biotinylation of recombinant proteins M1 and B7 of the variola virus during biosynthesis in CHO-K1 cells. To do this, co-expression of the biotin ligase BirA and target genes encoding the ectodomains of the M1 and B7 proteins with a C-terminal avi-tag was carried out in CHO-K1 cells in the presence of biotin in the culture medium. The optimal biotin concentration for the expression of M1 and B7 proteins was 125 μM. The production of biotinylated recombinant proteins has been complicated by low yields. To increase the production of target proteins, low molecular weight enhancers were added to the culture medium: lithium acetate, sodium valproate and caffeine. The enhancers increased the yield of the target protein by 1.3–4.9 times and did not affect the efficiency of biotinylation. The highest yield of biotinylated protein was achieved with the simultaneous addition of a concentration of 10 mM lithium acetate and 2.5 mM sodium valproate.

Keywords: recombinant viral proteins, biotinylation, biotin ligase BirA, biotin acceptor peptides (BAP)