



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.112.083

doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/13445

Очистка транскрипционного фактора YihW из пробиотического штамма *E. coli* Nissle 1917 с использованием аффинной хроматографии на спин-колонках

Татьяна Александровна Бессонова^{1,2✉}, Александр Евгеньевич Колонский³,
Егор Сергеевич Трубников⁴, Дмитрий Сергеевич Коршунов⁴,
Анна Михайловна Дукат^{3,5}, Михаил Сергеевич Гельфанд³,
Мария Николаевна Тутукина^{1,2,3}

¹ Институт биофизики клетки РАН (ФИЦ ПНЦБИ РАН), Пущино, Россия,
tatianabessonova66@gmail.com[✉]

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

³ Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵ École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Lausanne, Switzerland

Аннотация. Транскрипционные факторы бактерий в силу своей токсичности трудно поддаются экспрессии, а в силу склонности к олигомеризации - очистке, и для каждого белка требуется индивидуальный подбор оптимальных условий. В работе был создан вектор для суперпродукции транскрипционного фактора YihW (CsqR) из пробиотического штамма *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) и подобраны оптимальные условия для его синтеза в гомологичной экспрессионной системе: экспрессия в клетках штамма BL21(DE3)-Codon Plus-RIL; индукция 50мкМ IPTG в течение 5 часов при 37°C. Была разработана схема быстрой и эффективной очистки YihW с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA смоле, представленной в виде колонок для центрифугирования, сочетающая в себе условия для очистки белков в нативных и денатурирующих условиях, с последующим ступенчатым диализом. Разработанный нами метод позволяет получить гомогенный белковый препарат 95% чистоты, который является функционально активным. Активность полученного препарата YihW была подтверждена с помощью оценки эффективности его связывания с ДНК-мишенью путем электрофоретического разделения ДНК-белковых комплексов в полиакриламидном геле.

Ключевые слова: аффинная хроматография на Ni-NTA сорбенте, суперпродукция, YihW (CsqR), пробиотический штамм *E. coli*

Благодарности: Работа выполнена при поддержке РНФ 24-14-00276.

Для цитирования: Бессонова Т.А., Колонский А.Е., Трубников Е.С., Коршунов Д.С., Дукат А.М., Гельфанд М.С., Тутукина М.Н. Очистка транскрипционного фактора YihW из пробиотического штамма *E. coli* Nissle 1917 с использованием аффинной хроматографии на спин-колонках // Сорбционные и хроматографические процессы. 2025. Т. 25, № 5. С. 770-781. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13445>

Original article

Purification of the YihW Transcription Factor from the Probiotic *E. coli* Strain Nissle 1917 Using Affinity Chromatography on Spin Columns

Tatiana A. Bessonova^{1,2✉}, Alexander E. Kolonsky³, Egor S. Trubnikov⁴,
Dmitry S. Korshunov⁴, Anna M. Dukat^{3,5}, Mikhail S. Gelfand³, Maria N. Tutukina^{1,2,3}

¹ Institute of Cell Biophysics of RAS (FRC PSCBR RAS), Pushchino, Russian Federation,



tatianabessonova66@gmail.com 

²Vavilov Institute of General Genetics of RAS, Moscow, Russian Federation

³Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russian Federation

⁴M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

⁵École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Lausanne, Switzerland

Abstract. Due to their toxicity, bacterial transcription factors are difficult to be expressed, while their ability to form oligomers makes purification challenging. For each such protein, an individual approach is usually needed. Here, a vector for overproduction of the YihW (CsQR) from probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) transcription factor was constructed, and optimal conditions for its synthesis in homologous expression system were selected: expression in BL21(DE3)-Codon Plus-RIL; induction with 50 μ M IPTG for 5 hours at 37°C. A rapid and effective purification scheme was developed, based on the affinity chromatography on spin columns with the Ni-NTA sorbent and combining native and denaturing conditions, followed with step dialysis. The developed approach allows obtaining homogenous, 95% pure, functionally active protein. Activity of the produced YihW was confirmed using complex formation with its DNA target and subsequent electrophoretic separation of the DNA-protein complexes in polyacrylamide gel.

Keywords: Ni-NTA affinity chromatography, recombinant protein production, YihW (CsQR), probiotic *E. coli*

Acknowledgments: the work was carried out with the support of the Russian Science Foundation 24-14-00276.

For citation: Bessonova T.A., Kolonskiy A.E., Trubnikov E.S., Korshunov D.S., Dukat A.M., Gelfand M.S., Tutukina M.N. Purification of the YihW Transcription Factor from the Probiotic *E. coli* Strain Nissle 1917 Using Affinity Chromatography on Spin Columns. *Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2025. 25(5): 770-781. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpcchrom.2025.25/13445>

Введение

Белковые регуляторы (факторы транскрипции) играют важную роль в обеспечении оптимальной экспрессии генов и быстрого ответа клеток на сигналы окружающей среды. Особенно это важно для бактерий, процессы транскрипции и трансляции у которых тесно сопряжены во времени и пространстве и которым необходимо уметь быстро адаптироваться к новым условиям при попадании, например, в организм хозяев. Для понимания механизмов бактериальных адаптаций и разработки новых антимикробных препаратов нужно иметь представление о функциях как можно большего числа факторов транскрипции. Их функции изучают, в первую очередь, с использованием таких методов, как получение кристаллов белков и их последующий рентгеноструктурный анализ, а также электрофорез с задержкой в геле для оценки взаимодействия фактора транскрипции с его мишенью на ДНК. Все эти подходы требуют получения большого количества препарата исследуемого белка, что в случае факторов транскрипции затруднительно из-за их токсичности

для клеток-суперпродуцентов [1, 2]. Например, транскрипционный фактор FadR (регулятор синтеза жирных кислот) при суперпродукции значительно замедляет рост клеточной культуры и меняет морфологию бактерий даже при очень низких концентрациях IPTG (10 μ М) за счёт накопления повышенного количества фосфолипидов [3]. Для другого транскрипционного фактора, CsgD (отвечает за синтез определенного вида пилей для формирования биопленок), очистка даже регуляторного домена оказалась возможной только при индукции его синтеза при низкой температуре (20°C) [4].

Транскрипционный фактор YihW (CsQR) интересен тем, что он является локальным регулятором недавно открытого пути деградации сульфосахаров у *Escherichia coli* штамма K-12 MG1655. Было предсказано, что YihW действует как репрессор для кластера *yih*-генов, а сульфохиновоз (сульфоглюкоза) работает как эффекторная молекула [5, 6]. Кроме того, он может участвовать в регуляции альтернативного пути утилизации лактозы, наличие которого у кишечной палочки само по себе было неожиданно [5].



YihW (CsqR) относится к семейству DeoR ДНК-связывающих белков, которое характеризуется присутствием ДНК связывающего N-домена с мотивом спираль-поворот-спираль (НТН) и С-концевого домена, связывающего эффектор – в данном случае, сульфохиновозу. Получение и очистка белков этого семейства, как и других транскрипционных факторов бактерий, сопряжена с рядом трудностей.

В частности, в одной из первых работ по очистке белков этого семейства [7] для получения препарата GlpR (репрессор глицерол-3-фосфатного регулона) авторы использовали сложную многоступенчатую схему, включающую очистку на полиэтиленимине, фракционирование сульфатом аммония и последующую хроматографию на фосфоцеллюзне и ДЭАЭ-сепадексе. В результате был получен препарат высокой степени очистки, но в очень маленьком количестве (6 мг белка из 4 литров культуры). Авторы другого исследования при попытке очистить белок DeoR (репрессор оперона дезоксирибозы) отмечали высокую токсичность его высоких концентраций для клеток и низкую естественную экспрессию данного регулятора [8]. Поэтому для получения большего количества белка в растворимой фракции была использована конструкция с дополнительным регулируемым промотором, позволяющим подавлять экспрессию гена целевого белка до направленной индукции. Это позволило получить 4% белка в растворимой фракции. Очистку проводили при помощи высаливания разными концентрациями сульфата аммония с последующей катионнообменной хроматографией на фосфоцеллюзне и гель-фильтрацией на Сепадексе G200. Несмотря на многостадийную очистку, чистота белкового препарата составила всего 80%.

В более позднем исследовании DeoR из *Bacillus subtilis* был очищен уже при помощи аффинной хроматографии на Ni-

NTA сефарозе, но с интересными модификациями протокола, такими как осаждение ДНК/РНК при помощи стрептомицина сульфата [9]. Аффинная хроматография на никель-содержащих твердофазных носителях (сефароза, агароза, магнитные частицы) позволяет получить высокоочищенный препарат белка в фактически в один этап и легко масштабируется. На первом этапе происходит специфическое связывание остатков гистидина (гистидиновой метки или “тага”) белка с ионами никеля, ковалентно пришитыми к носителю, а затем, после серии промывок от неспецифически адсорбированных белков, целевой белок снимается с носителя высокими концентрациями имидазола, которые замещают гистидин. Тем не менее, выход чистого DeoR в этом случае был очень мал – с трех литров культуры бактерий-суперпродуцентов было получено всего 40 мг препарата белка [9], хотя его чистота была существенно выше и составляла около 95%.

Еще одним вариантом аффинной хроматографии для очистки регулятора семейства DeoR может быть хроматография с использованием в качестве метки белка, связывающего мальтозу (maltose binding protein, MBP). Таким образом была проведена очистка регулятора транспорта и утилизации L-аскорбата UlaR [10]. Использование MBP позволило увеличить растворимость рекомбинантного белка и усилить эффективность связывания с носителем по сравнению с Ni-NTA. Однако, как и в случае использования в качестве метки глутатионсульфотрансферазы, MBP за счет своего размера (около 40 кДа) может повлиять на структуру белка и его функциональную активность. Поэтому необходимо проведение дополнительного ферментативного отщепления MBP и очистки от MBP и протеазы, что усложняет и удлиняет протокол, приводя к снижению выхода целевого белка. Данные о способах очистки

K-12 1	MSLTTELGNPRHDQLLMLIAERGYNMIDELANLLDVSTQVRRDIRKLSEQGLITRHHGG	60
Nissle 1	MSIIIEVTGPNRHDQLVHLIAERGYNMIEELAQLLDVSTQVRRDIRKLSEQGLITRHHGG	60
	Asp69 Arg75	
K-12 61	AGRASSVVA ⁶⁹ TAFEQEV ⁷⁵ TEEKKAI ⁷⁶ AEAVADY ⁷⁷ IPDGSTIFITG ⁷⁸ TEHVARALLNNH	120
Nissle 61	AGRASSVVA ⁶⁹ TAFEQEV ⁷⁵ TEEKKAI ⁷⁶ AEAVADY ⁷⁷ P+T ⁷⁸ T-FITIGT ⁷⁹ TEHVARALLNNH	120
	Arg150 Asn153	
K-12 121	LRIITNSLRLVAH ¹⁵⁰ YHNPRFEV ¹⁵¹ MPGGT ¹⁵² UH ¹⁵³ GGIIGPSAASFVADFRADYL ¹⁵⁴ TVGAI	180
Nissle 121	LRIITNSLRLVA ¹⁵⁰ ILY ¹⁵¹ EVMPGGT ¹⁵² UH ¹⁵³ GGIIGPSAASFVADFRADYL ¹⁵⁴ TVGAI	180
	Glu193	
K-12 181	ESDGALM ¹⁹³ EFDV ¹⁹⁴ NA ¹⁹⁵ ANVVKTMMAHARNILLV ¹⁹⁶ A ¹⁹⁷ YH ¹⁹⁸ HASAAVEIGNVAQVTALFTDELPP	240
Nissle 181	E ¹⁹³ DG ¹⁹⁴ L ¹⁹⁵ EFDV ¹⁹⁶ NA ¹⁹⁷ V ¹⁹⁸ +T ¹⁹⁹ M ²⁰⁰ HARN ²⁰¹ LLVAD ²⁰² TK ²⁰³ ASAAV ²⁰⁴ IGN ²⁰⁵ V ²⁰⁶ A ²⁰⁷ FTD ²⁰⁸ PP	240
	Asp212 Lys215	
K-12 241	AALKSRLQDSQIEIIILPQED ²⁶⁰	260
Nissle 241	+ ²⁶¹ L ²⁶² + ²⁶³ ++ ²⁶⁴ ++ ²⁶⁵ NSFCQLLSEENVELVVAEQE ²⁶⁶	260

Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей YihW (CsqR) из штаммов *E. coli* K-12 MG1655 и Nissle 1917 с помощью инструмента BLAST. Красными прямоугольниками выделены аминокислоты, отвечающие за взаимодействие белка с лигандом [13].

Fig. 1. Comparison of the *E. coli* K-12 MG1655 and Nissle 1917 YihW (CsqR) amino acid sequences using the BLAST tool. The amino acids responsible for the interaction of the protein with the ligand are highlighted in red rectangles [13].

других транскрипционных факторов семейства DeoR в *E. coli* на настоящий момент отсутствуют.

Штамм *E. coli* Nissle 1917 (EcN) – один из пробиотических штаммов кишечных палочек, который имеет такой же метаболический профиль, как и другие штаммы *E. coli*, но не несёт в своем геноме факторов патогенности и не продуцирует энте-ротоксинов. EcN является основным компонентом препарата «Мутафлор», который активно используют для лечения нарушений кишечного микробиома [11, 12]. Количество генов, входящих в *yih*-кассету, у EcN меньше, чем у K-12 MG1655, для которого было показано участие этих генов в метаболизме сульфосахаров – всего 4 из 10. При этом по результатам сравнительно-геномного анализа YihW (CsqR) из Nissle 1917 имеет всего 72% сходства с белком из *E. coli* K-12 (рис. 1). Ранее нами уже был очищен белок CsqR из лабораторного штамма *E. coli* K-12 MG1655 с помощью стандартного протокола аффинной хроматографии [13].

Задачей настоящего исследования было получение очищенного препарата белка YihW (CsqR) из *E. coli* Nissle 1917 и оценка его функциональной активности для дальнейшего изучения механизмов функционирования сульфогликозидаз и его регуляции в пробиотическом штамме.

Экспериментальная часть

Создание экспрессионного вектора.

Экспрессионный вектор был создан на основе pGEMΔXba (экспрессионный вектор на базе pGEMEX1 (Promega), AmpR) [14]. Вектор содержит промотор РНК-полимеразы фага T7, для индукции транскрипции с которого используется изопропил-β-D-1-тиогалактозид (IPTG). Для амплификации гена *yihW* (*csqR*) с геномной ДНК штамма *E. coli* Nissle 1917 (GenBank NZ_CP082949.1) были использованы олигонуклеотиды, содержащие сайты узнавания рестриктиазы XbaI (выделены жирным шрифтом) (табл. 1). Для возможности очистки белка с помощью аффинной хроматографии на Ni (Ni-нитрилтриуксусная кислота) – NTA смоле на 3'- конец мРНК *yihW* (*csqR*) была добавлена последовательность, кодирующая шесть последовательных гистидинов (his-tag). Праймеры были сконструированы для двух вариантов векторной вставки: **reg** – кроме собственного гена *yihW* (*csqR*) вставка имеет на 5'-конце мРНК собственный сайт связывания регуляторных белков и рибосомы; **noreg** – только вставка гена *yihW* (*csqR*) непосредственно под T7-промотор. Это было сделано для того, чтобы выключать транскрипцию гена *yihW* (*csqR*) при суперпродукции белка в клетке, тем самым позволяя транскрипционному фактору

Таблица 1. Праймеры для амплификации
 Table 1. Primers for amplification.

Название олигонуклеотида (праймера)	Последовательность олигонуклеотида
Nissle_YihW_Fwd_reg	5' – ATGCTCTAGATGGTAAACATCTACCG – 3'
Nissle_YihW_Fwd_noreg	5' – AAATTCTAGACATCTACCGAGGAG – 3'
NissleYihW_Rev_his	5'- AGTTTCTAGATCA G TGATGGT G ATGG G ATACTTCTGCTCGGCA– 3'

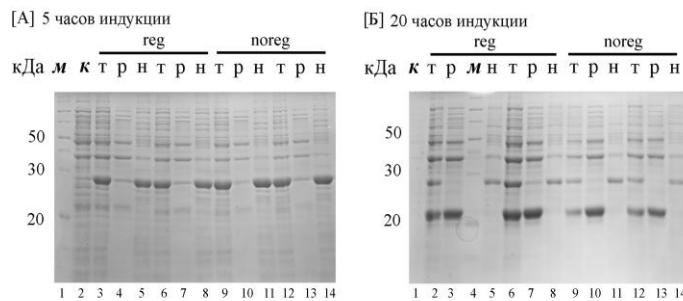


Рис. 2. Подбор условий суперпродукции YihW (CsqR) из *E. coli* Nissle1917. Приведены данные для штамма BL21 (DE3) RIL. [А] – пробы, отобранные после 5 часов индукции (дорожки 3-5, 9-11 – 50 мкМ IPTG, 6-8, 12-14 – 100 мкМ IPTG); [Б] – пробы, отобранные после 20 часов индукции (дорожки 2,3,5 и 9-11 – 50 мкМ IPTG, 6-8, 12-14 – 100 мкМ IPTG). К – контроль до индукции, М – маркер белкового веса, Т – тотальная фракция, Р – растворимая фракция, Н – нерастворимая фракция.

Fig. 2. Search for the optimal conditions for the overproduction of YihW (CsqR) from *E. coli* Nissle 1917. Data for the BL21 (DE3) RIL strain are presented. [A] – samples taken after 5 hours of induction (tracks 3-5, 9-11 – 50 mKm IPTG, 6-8, 12-14 – 100 mKm IPTG); [B] – samples taken after 20 hours of induction (tracks 2,3,5 and 9-11 – 50 mKm IPTG, 6-8, 12-14 – 100 mKm IPTG). K – control before induction, M – protein weight marker, T – total fraction, P – soluble fraction, H – insoluble fraction.

накапливаться преимущественно в растворимой фракции клеточного лизата, как это было сделано в [8, 15]. Полученные векторы были названы pGEM_YihW_Nissle_reg и pGEM_YihW_Nissle_noreg и проверены на отсутствие мутаций прямым секвенированием по Сенгеру (Евроген, Россия).

Штамм *E. coli* Nissle 1917 был получен из препарата «Мутафлор» (Ardeypharm GmbH, Германия) посредством высеяна сначала в жидкую, а потом на твердую среду LB (Luria-Bertani (10 г/дм³ триптона, 5 г/дм³ дрожжевого экстракта, 10 г/дм³ NaCl 10, опционально агар 20 г/дм³)) с последовательным разбавлением и отбором чистых колоний. Для подтверждения принадлежности высеянного штамма к *E. coli* Nissle 1917 было

проведено полногеномное секвенирование (PRJNA1176130 ID:1176130). В качестве референсного генома использовали геном *Escherichia coli* Nissle 1917 из базы данных GenBank (идентификатор NZ_CPO82949.1).

Суперпродукция белка YihW (CsqR). Для подбора оптимальных условий индукции белка YihW в гомологичной системе были использованы штаммы *E. coli* BL21*(DE3) и BL21(DE3)-Codon Plus-RIL, в геноме которых содержится ген РНК-полимеразы фага T7. Клетки трансформировали с помощью химической трансформации векторами pGEM_YihW_Nissle_reg и pGEM_YihW_Nissle_noreg и растяли на твердой среде LB в присутствии 200 мКг/мл ампициллина (2S,5R,6R)-6-[(R)-



2-амино-2-фенилацетамидо]-3,3-диметил-7-оксо-4-тиа-1-азабицикло[3.2.0]-гептан-2 карбоновая кислота в виде тригидрата натриевой соли) при 37°C до появления отчетливо видимых колоний (около 16 часов). Трансформанты пересевали в жидкую стерильную среду LB, содержащую 200 мкг/см³ ампициллина, и растили при 37°C и постоянном перемешивании 121 об/мин на воздушной бане (Bio-san, Латвия) около 16-ти часов. 1 см³ полученных культур переносили в 200 мл жидкой стерильной среды LB или TB (Terrific Broth (12 г/дм³ казеинового пептона 24 г/дм³ дрожжевого экстракта, 0.4% глицерина, 0.17 М KH₂PO₄, 0.72 М K₂HPO₄)) с 200 мкг/см³ ампициллина и растили при перемешивании 125 об/мин на воздушной бане и 37°C до добавления индуктора IPTG на значении ОП₆₀₀ = 0.15-0.2. Для оптимизации протокола использовали различные концентрации IPTG: 10 мкМ, 20 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ, и разное время продолжительности индукции (3, 5 и 16 часов). Разделение белков клеточного лизата на растворимую и нерастворимую фракцию проводили с помощью реактива BugBuster (Millipore, США). Уровень экспрессии белка оценивали при помощи электрофореза в денатурирующем 12.5% полиакриламидном геле (ПААГ) с окрашиванием Кумасси R-250 по стандартному протоколу. Результаты подбора условий индукции представлены на рис. 2. Клетки с суперпродуцированным YihW осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 15 минут при +4°C на центрифуге Eppendorf 5804R (Германия).

Никель-аффинная хроматография на спин-колонках. Для быстрой очистки белка YihW (CsqR) использовали набор Ni-NTA Spin Kit (50) (Qiagen, Германия). В состав набора входят колонки для центрифугирования, содержащие силикагелевую Ni-NTA смолу, которая сочетает в себе все преимущества Ni-NTA носителей и силикагеля, минимизирующего не-

специфические гидрофобные взаимодействия. Ni-NTA силикагелевая смола может быть использована для очистки белков как в нативных, так и в денатурирующих условиях [16]. В данной работе мы модифицировали протокол производителя для очистки в денатурирующих условиях [17], что позволило увеличить выход целевого рекомбинантного белка. Для этого осадок клеток, содержащих целевой белок, тщательно ресуспендировали в растворе стерильного однократного фосфатно-солевого буфера (1xPBS: 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1.8 мМ KH₂PO₄, pH 7.4), снова центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 минут при +4°C на центрифуге Eppendorf 5804R (Германия), супернатант убирали. К осадку добавляли 10 см³ 1xPBS, содержащего 1мМ PMSF (фтор(фенил)метилсульфонил) и 1мМ DTT (1,1,1-трихлор-2,2-бис(4-хлорфенил)этан), тщательно перемешивали и подвергали обработке ультразвуком (QSonica Sonicator Q125, США) в течение 15 минут в следующем режиме: 10 секунд пульс, 20 секунд выключен, 45% интенсивности. После обработки ультразвуком образцы центрифугировали при 12500 об/мин 10 минут на настольной центрифуге (MiniSpin Plus, Германия) при комнатной температуре. Надосадочную жидкость сохраняли при +4°C для дальнейшего нанесения на гель для оценки растворимой фракции лизата, а осадок хорошо перемешивали в 1x PBS, содержащем 1% Triton X-100 (2-[4-(2,4,4-триметилпентан-2-ил)фенокси]этанол), 1мМ DTT (дитиотрейтол) и 1мМ PMSF и снова центрифугировали 12 500 об/мин 10 минут на MiniSpin Plus при комнатной температуре. Надосадочную жидкость убирали, а осадок растворяли в 2 мл буфера для нанесения (50мМ NaH₂PO₄, 300мМ NaCl, 5мМ имидазол (1Н-имидазол), 8М мочевина (диамид угольной кислоты), pH 8.0) и наносили на предварительно уравновешенную спин-колонку. Колонку

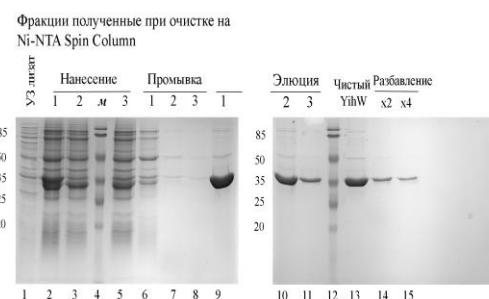


Рис. 3. Фракции, полученные в процессе очистки белка YihW (CsQR) с помощью сорбции на Ni-NTA носитель. Описание фракций приведено над дорожками. На дорожки 4 и 12 нанесен маркер молекулярного веса.

Fig. 3. Fractions obtained during the purification of the YihW (CsQR) protein by sorption onto a Ni-NTA carrier. The fractions are described above the tracks. A molecular weight ladder was loaded onto the tracks 4 and 12.

уравновешивали 600 мкл буфера для нанесения (50мМ NaH_2PO_4 , 300мМ NaCl , 5мМ имидазол, 8М мочевины, pH 8.0) при 2900 об/мин 2 минуты (на центрифуге Eppendorf MiniSpin Plus). Далее наносили 600 мкл подготовленного образца, центрифугировали при 1600 об/мин 2 минуты, добавляли остатки образца и центрифугировали еще 5 минут при 1000 об/мин. Если не весь образец успевал проходить через колонку, то центрифугировали ещё 2 минуты при 1300 об/мин (на центрифуге Eppendorf MiniSpin Plus). Двойное нанесение образца продиктовано тем, что объем образца после обработки ультразвуком вдвое превышал объем колонки. Данный этап позволяет увеличить количество сорбированного белка и, как следствие, его конечную концентрацию в элюате, что избавляет от необходимости в дополнительном этапе концентрирования очищенного препарата. Далее колонку промывали промывочным буфером 3 раза (50мМ NaH_2PO_4 , 300мМ NaCl , 20мМ имидазол, 8М мочевина, pH 8.0) центрифугированием 2000 об/мин по 2 минуты (Eppendorf MiniSpin Plus). Связавшийся с колонкой белок элюировали 200 мкл буфера (50мМ NaH_2PO_4 , 300мМ NaCl , 500мМ имидазол, 8М мочевина, pH 8.0) с последующим центрифугированием в течение 2 минут 2900 об/мин 2-3 раза. После каждого акта центрифугирования

фракции собирали для визуального анализа в денатурирующем 12.5% ПААГ, которые представлены на рис. 3 (Дорожки 1-11). Собранные после элюции фракции объединяли в одну и последовательно диализовали (мембрана CelluSep 3кДа, США) против буферов состава: (1) 50мМ NaH_2PO_4 , 300мМ NaCl , 6М мочевина, pH 8.0; (2) 50мМ NaH_2PO_4 , 300мМ NaCl , 4М мочевина, pH 8.0; (3) 50мМ NaH_2PO_4 , 300мМ NaCl , 2М мочевина, pH 8.0 при +4°C с постоянным перемешиванием минимум по 4 часа (каждый акт диализа). Наличие белка в пробах после диализа проверяли с помощью денатурирующего электрофореза в 12.5% ПААГ с последующим окрашиванием Кумасси R-250 по стандартному протоколу (рис. 3 дорожка 13). Качественную оценку содержания белка во фракциях проводили при помощи спектрофотометра Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, США).

Оценка функциональной активности полученного препарата. Функциональную активность YihW (CsQR) оценивали методом электрофореза с задержкой в геле (Electrophoretic mobility shift assay, EMSA), как описано в [18], по его способности связываться с основной мишенью в геноме – межгенной областью, которая находится между оперонами *yihUTSR* и *yihVW* (кратко – область *yihU/V*) и присутствует как в геноме штамма K-12, так и в геноме штамма EcN. Для получения

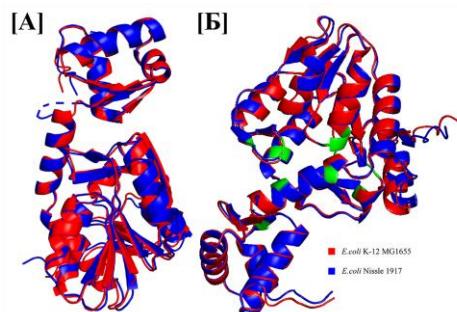


Рис. 4. [А] Наложение структур YihW (CsQR) из *E. coli* K-12 и *E. coli* Nissle 1917.

Структура YihW (CsQR) из *E. coli* K-12 загружена из базы данных AlphaFold [https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P32144]. Для YihW (CsQR) из *E. coli* Nissle 1917 модель была предсказана на сервере AlphaFold [https://alphafoldserver.com/ data обращения 2025-04-16_21:53] с параметрами по умолчанию. На панели [Б] зеленым цветом указаны ключевые аминокислоты, вовлеченные во взаимодействие белка с лигандом [13].

Fig. 4. [A] Superposition of YihW (CsQR) structures from *E. coli* K-12 and *E. coli* Nissle 1917. The YihW (CsQR) structure from *E. coli* K-12 was downloaded from the AlphaFold database [https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P32144]. For YihW (CsQR) from *E. coli* Nissle 1917, the model was predicted on the AlphaFold server [https://alphafoldserver.com / accessed 2025-04-16_21:53] with default parameters. Panel [B] shows in green the key amino acids involved in the protein-ligand interaction [13].

фрагментов ДНК, содержащих регуляторную область *yihU/V* из EcN использовали универсальные для *E. coli* праймеры для этой области: *yihU/V_F_uni* 5'-CAATARATTGTYTMGCCATTGG-3' и *yihU/V_R_uni* 5'-KGTKATACCYACRCAWGCAA-3'. Реакцию амплификации проводили с помощью готовой смеси для ПЦР 5Х ScreenMix (Евроген, Россия) с геномной ДНК *E. coli* Nissle 1917 и следующих условиях: 95°C – 2 минуты, 30 циклов: 95°C – 15 секунд, 54°C – 30 секунд, 72°C – 40 секунд; досинтез 72°C – 3 минуты, хранение на +4°C. Амплифицированные фрагменты очищали при помощи Monarch Gel Extraction Kit (NEB, Англия) по протоколу производителя. Комплексы формировали в связывающем буфере (50мМ Tris-Cl, 100мМ KCl, 50% глицерин, 1мМ EDTA) при 30°C в течении 30 минут. Непосредственно перед нанесением на гель, не вынимая пробы из термостата, добавляли в каждую из них 3 мкл подогретого до 30°C 50% глицерина и быстро наносили на предварительно прогретый при 240В в 1xTBE буфере (89мМ три, 89мМ борная кислота, 2мМ

ЭДТА) 5% ПААГ. Электрофорез проводили в камере для вертикального электрофореза BioRad (США) при постоянном напряжении 200В в течение 20 минут [19]. Для визуализации результата гель окрашивали бромистым этидием (3,8-дiamino-5-этил-6-фенилфенантридиний бромид).

Обсуждение результатов

YihW – основной регулятор экспрессии генов *yih*-кассеты, необходимых клеткам *E. coli* для утилизации сульфоглюкозы в среде с низким содержанием или отсутствием других источников углерода. Исследуемый нами белок находится в пробиотическом штамме Nissle 1917 [11,12]. Изучение биохимических свойств и функциональной активности таких регуляторов способствует более полному пониманию механизмов переключения клетки от одного образа жизни к другому, а также их способности быстро менять источники углерода при попадании в новые условия.

На рисунке 4 представлено сравнение структур YihW из пробиотического штамма *E. coli* Nissle 1917 и лаборатор-



ного K-12 MG1655. Различия в аминокислотной последовательности (рис. 1), по-видимому, не влияют на структуру как ДНК-связывающего, так и эффекторного доменов (рис. 4), а аминокислоты, отвечающие за связывание белков с лигандом, являются консервативными (рис. 1 и рис. 4). Это свидетельствует в пользу того, что, вероятнее всего, эти белки имеют похожие регуляторные свойства.

Как и для многих других факторов транскрипции, работа с YihW (CsqR) была осложнена, так как не удавалось получить целевой белок в растворимой фракции. Чаще всего мы даже не видели суперпродукцию белка, и его содержание в контрольных пробах до индукции не отличалось от проб после индукции. Оказалось, что для YihW (CsqR) не работают стандартные методы, которые мы использовали ранее для наработки транскрипционных факторов: добавление индуктора на середине экспоненциальной фазы роста (ОП600~0.3) и, позднее; добавление в векторную конструкцию перед геном его собственной регуляторной области (конструкция *reg*); снижение концентрации IPTG (до 10 мкМ) и другие.

В результате оптимальными условиями индукции белка YihW (CsqR) из штамма *E. coli* Nissle 1917 оказались (рис. 2): штамм BL21(DE3)-CodonPlus-RIL, рост при 37°C, 125 об/мин на воздушной бане, среда LB с ампициллином 200 мкг/мл, добавление индуктора IPTG на отметке ОП600=0.1-0.15 (около 3 часов роста), конечная концентрация IPTG 50мкМ, индукция в течение 5 часов (рис. 2 А). При этом полноразмерный белок YihW (CsqR) (около 29 кДа) накапливается преимущественно в нерастворимой фракции, но в достаточном для дальнейшей очистки количестве с использованием 8М мочевины. Видимых различий при использовании разных конструкций (*reg* и *noreg*) мы не наблюдали. На рис. 2Б можно заметить, что при более продолжительной индукции (20 часов) в клетках накапливается укороченная

форма белка. Это может свидетельствовать о том, что в штамме *E. coli* Nissle 1917 синтезируются две формы белкового продукта гена *yihW* (*csqR*), как это было показано для YihW (CsqR) штамма K-12 [13], что позволяет предположить сходные регуляторные механизмы. Это предположение требует дальнейшего изучения, поскольку в данном случае нельзя исключить процессы протеолиза.

Ещё одной сложностью оказалось то, что стандартный протокол набора Ni-NTA Spin Column (Qiagen) для очистки белков в денатурирующих условиях оказался неприменим к очистке YihW (CsqR). В протоколе производителя очистку белка с использованием в качестве денатуранта 8 М мочевины предлагают осуществлять при помощи промывки колонки буферами с различным pH и высокой концентрацией фосфатного буфера (100мМ NaH₂PO₄) и низкой концентрацией натриевой соли. В нашем случае при использовании такого подхода значительная часть белка не связывалась с колонкой и обнаруживалась в «проскоке». Поэтому нами был разработан оптимизированный протокол очистки YihW с использованием рекомендованных производителем для нативных условий буферов со сниженной до 50мМ концентрацией фосфатов и довольно высокой концентрацией соли Na (300мМ NaCl), но с 8М мочевиной и имидазолом, что не было предусмотрено производителем этих спин-колонок. Использованная нами схема очистки YihW (CsqR) позволяет быстро получить белковый препарат с чистотой около 95% (рис. 3) и в количестве около 56 мг чистого белка из 200 мл культуры клеток.

Интересным наблюдением стало то, что агрегаты, которые формируются в силу повышенной гидрофобности YihW (CsqR) при диализе против буфера с 2М мочевиной, частично растворяются при разбавлении белка в однократном фосфатно-солевом буфере или в связываю-

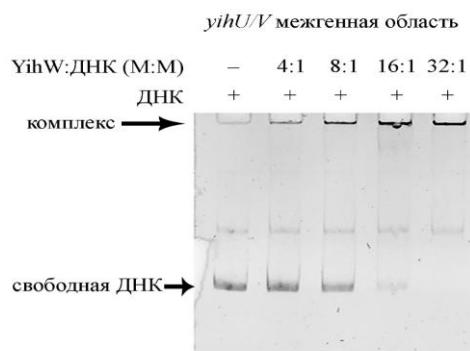


Рис. 5. Оценка эффективности формирования ДНК-белковых комплексов между полученным препаратом YihW и фрагментом ДНК, содержащим межгенную область *yihU/V*. Молярное соотношение указано над дорожками. Связывание YihW (CsqR) с его регуляторной областью *yihU/V* проводили при 30 °C.

Fig. 5. Efficiency of the DNA-protein complex formation between the obtained YihW and the DNA fragment containing *yihU/V* intergenic region. Molar ratios are shown above the tracks.

YihW (CsqR) binding with the *yihU/V* regulatory region was allowed at 30°C.

щем буфере для электрофореза с задержкой в геле (50мМ Tris-Cl, 100мМ KCl, 50% глицерин, 1мМ EDTA) в 2 и в 4 раза (рис. 3, дорожки 14 и 15). Возможно, белки этого семейства могут образовывать октамеры в водных растворах [8], что может объяснять образование растворимых агрегатов. Конечные концентрации белка после разведения составляли 0.28 и 0.16 мг/см³ соответственно. Этого было достаточно для тестов на функциональную активность белка YihW (CsqR) как транскрипционного фактора.

Удивительным образом белок после агрегации в буфере с 2М мочевиной не потерял свою функциональную активность, а дальнейшее разбавление в буфере связывания, по-видимому, приводит к восстановлению его нативной структуры и функциональной активности. Функциональная активность факторов транскрипции оценивается по эффективности их связывания с ДНК-мишенями. Для YihW основной мишенью является область между генами *yihU* (кодирует сульфолактальдегидредуктазу) и *yihV* (кодирует сульфофруктокиназу). Результаты электрофореза с задержкой в геле, приведенные на рис. 5, показывают, что полученный препарат YihW эффективно связывается со своей основной мишенью в геноме штамма Nissle 1917, и при 16-

кратном молярном избытке белка оказывается связанной вся ДНК. Это свидетельствует о высокой активности белка, поскольку в других исследованиях для полного связывания фрагмента ДНК, содержащего эту же регуляторную область, потребовался 200-кратный избыток YihW [6].

Заключение

Таким образом нами была разработана схема экспрессии и очистки белка YihW (CsqR) из *E. coli* Nissle 1917 при помощи специфической сорбции на Ni-NTA спин-колонки в денатурирующих условиях в присутствии 8М мочевины, что значительно ускоряет процесс очистки и позволяет получить однородный и функциональный белковый препарат этого транскрипционного фактора. Активность полученного препарата была подтверждена с помощью электрофореза с задержкой в геле, и он может быть использован в дальнейших экспериментах.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.



Список литературы/References

1. Shulami S., Gat O., Sonenshein A. L., Shoham Y. *Journal of bacteriology*. 1999; 181(12): 3695-704. <https://doi.org/10.1128/JB.181.12.3695-3704.1999>
2. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. *Molecular systems biology*. 2006; 2:2006.0008. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>
3. Cronan J.E. *Molecular microbiology*. 2021; 115(6): 1080-1085. <https://doi.org/10.1111/mmi.14663>
4. Wen Y., Ouyang Z., Devreese B., He W., Shao Y., Lu W., Zheng F. *Protein Science*. 2017; 26: 2073-2082. <https://doi.org/10.1002/pro.3245>
5. Kaznadzey A., Shelyakin P., Belousova E., Eremina A., Shvyreva U., Bykova D., Eme-lianenko V., Korosteleva A., Tutukina M., Gel-fand M.S. *Scientific Reports*. 2018; № 8(1): 3177. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21534-3>
6. Shimada T., Yamamoto K., Nakano M., Watanabe H., Schleheck D., Ishihama A. *Microbiology*. 2019; 165(1): 78-89. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000740>
7. Larson T. J., Ye S., Weissenborn D.L., Hoffmann H.J., Schweizer H. *The Journal of Biological Chemistry*. 1987; 262(33): 15869-15874. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47669-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47669-7)
8. Mortensen L., Dandanell G., Hammer K. *The EMBO journal*. 1989; 8(1): 325-331. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03380.x>
9. Zeng X., Saxild H.H., Switzer R.L. *Journal of bacteriology*. 2000; 182(7): 1916-22. <https://doi.org/10.1128/JB.182.7.1916-1922.2000>
10. Garces F., Fernandez F.J., Gomez A.M., Perez-Luque R., Campos E., Prohens R., Aguilar J., Baldoma L., Coll M., Badia J., Cristina Vega M. *Biochemistry*. 2008; 47(44): 11424-11433. <https://doi.org/10.1021/bi800748x>
11. Sonnenborn, U., Schulze, J. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2009; 21(3-4): 122-158. <https://doi.org/10.3109/08910600903444267>
12. Sonnenborn U. *FEMS Microbiol Lett*. 2016; 363(19): fnw212. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw212>.
13. Rybina A.A., Glushak R.A., Bessonova T.A., Dakhnovets A.I., Rudenko A.Y., Ozhi-ganov R.M., Kaznadzey A.D., Tutukina M.N., Gelfand M.S. *Scientific Report*. 2024; 14(1): 7852. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58492-y>
14. Igarashi K., Ishihama A. *Cell*. 1991; 65(6): 1015-1022. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90553-b](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90553-b)
15. Bessonova T.A., Lekontseva N.V., Shvyreva U.S., Nikulin A.D., Tutukina M.N., Ozoline O.N. *Protein expression & purification*. 2019; 161: 70-77. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.05.001>
16. Potapova, A. V., Ozoline, O. N., Tutukina, M. N. The development of effective over-production and purification approaches for ExuR transcription factor of *Escherichia coli* using a fine chromatography. *Sorbtionnye I Khromatograficheskie Protsessy*, 2014; 14(3): 537-539. (In Russ.)
17. Protokol proizvodstva dlya Ni-NTA Spin Kit (Qiagen). Rezhim dostu-pa: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/protein-purification/tagged-protein-expression-purification-detection/ni-nta-spin-system>. (data obrashheniya: 15.05.2025) (In Russ.)
18. Ozoline O.N., Fujita N., Murakami K., Ishihama A. *European Journal of Biochemistry*. 1998; 253(2): 371-81. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2530371.x>
19. Laemmli U.K. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Информация об авторах / Information about the authors

Т.А. Бессонова – к.б.н., научный сотрудник Института биофизики РАН – обособленного подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия; научный сотрудник Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

А.Е. Колонский – магистрант, факультет почвоведения, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Т.А. Бессонова –PhD, research scientist, Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Russian Federation; research scientist, Vavilov Institute for General Genetics RAS, Moscow, Russian Federation, e-mail: tatianabessonova66@gmail.com

А.Е. Колонский –master's student, Faculty of Soil Science, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, e-mail: alej.kolonsky@gmail.com



Е.С. Трубников – магистрант кафедры микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Д.С. Коршунов – студент биологического факультета, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

А.М. Дукат – аспирант, Федеральная политехническая школа Лозанны, Лозанна, Швейцария

М.С. Гельфанд – д.б.н., профессор, вице-президент по наукам о жизни Сколковского института науки и технологий, Москва, Россия

М.Н. Тутукина – к.б.н., старший научный сотрудник Центра Молекулярной и Клеточной Биологии, Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

E.S. Trubnikov – Master's student, Department of Microbiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, e-mail: etrubnikov2002@mail.ru

D.S. Korshunov – student, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, e-mail: korshunds@yandex.ru

A.M. Dukat – PhD student, École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Lausanne, Switzerland, e-mail: anna.dukat.m@gmail.com

M.S. Gelfand – Dr. Sci., professor, vice-president, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russian Federation, e-mail: mikhail.gelfand@gmail.com

M.N. Tutukina – PhD, senior research scientist, Centre of Molecular and Cellular Biology, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russian Federation, e-mail: m.tutukina@skoltech.ru

Статья поступила в редакцию 24.07.2025; одобрена после рецензирования 17.11.2025; принята к публикации 26.11.2025.

The article was submitted 24.07.2025; approved after reviewing 17.11.2025; accepted for publication 26.11.2025.