

*Жидецкий А.В.<sup>1</sup>, Бондарюк Е.В.<sup>1</sup>, Качан А.В.<sup>1</sup>, Круглик А.С.<sup>2</sup>,  
Шманай В.В.<sup>2</sup>, Шолух М.В.<sup>1</sup>*

## **Получение флуоресцентно меченого рекомбинантного эфрина-А5**

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь

<sup>2</sup>ГНУ «Институт Физико-органической химии НАН Беларуси»,  
г. Минск, Беларусь

Эфриновые рецепторы и их мембраносвязанные лиганды эфрины играют важную роль во время эмбриогенеза, при росте аксонов и межклеточных взаимодействиях. В процессе канцерогенеза они участвуют в неоангиогенезе, метастазировании и инвазии опухолевых клеток. В связи с этим данная группа рецепторов и их лигандов представляет несомненный интерес в качестве объектов целевой терапии рака и па-

тогенезе тканей [1, 2]. Однако до настоящего времени изучение лиганд-рецепторного взаимодействия сдерживается отсутствием надежной и относительно простой системы детекции. Одной из таких систем может быть детекция переноса энергии между меченными разными флуоресцентными соединениями лигандом и рецептором при их взаимодействии. В связи с этим целью работы явилось получение конъюгата высокоочищенного лиганда эфрина-А5 с флуоресцентным красителем.

Рекомбинантный эфрин А5, входящий в состав фьюжн белка эфрин-А5-(His)<sub>6</sub>-тиоредоксин (Trx), получали из телец включения после их интенсивной отмычки от примесей белков и нуклеиновых кислот. Тельца включения солубилизировали в растворе с 50 ммоль/л Tris-HCl, рН 8 с 8 моль/л мочевиной. Осветленный центрифугированием солубилизиат наносили на колонку с Ni-сефарозой для связывания целевого белка. Элюировав фьюжн белок, проводили его сульфитолиз в течение ночи, добавляя к образцу Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. Затем добавляли тромбин из расчета 1 U на 0,5 мг фьюжн белка для удаления Trx-фрагмента. Разделение последнего и эфрина-А5 достигалось на Ni-сефарозе. Гомогенность препарата эфрина-А5 подтверждена электрофорезом в ПААГ. Конъюгат с флуоресцентной меткой получали по реакции ацилирования ε-аминогрупп лизина в белке с помощью N-гидроксисукцинимидного эфира цианинового красителя Cy5. Так как высокая липофильность красителя приводила к денатурации эфрина А5, мы использовали водорастворимый аналог – сульфо-Cy5. Отделение конъюгата от сводного красителя проводили методом гель-фильтрации. Образование комплекса эфрин А5 - сульфо-Cy5 определяли по спектрам поглощения в УФ-видимой области.

Установлено, что молярный коэффициент экстинкции Cy5 в комплексе с эфрином при длине волны 655 нм составляет 250000 см<sup>2</sup>/моль, а при длине волны 280 нм – 10000 см<sup>2</sup>/моль.

#### Литература

1. Himanen J.-P., Nikolov D. Eph receptors and ephrins. // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2003. V. 35. P. 130 – 134
2. Pasquale E.B. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signaling and beyond. // Nat. Rev. Cancer. 2010. V. 10. P. 165–180.