

Аффинные теги для очистки рекомбинантных белков

Е.М.Мазурина, М.Е.Платонов, А.С.Трунякова, С.В.Дентовская

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

К настоящему времени разработано множество различных тегов для очистки белков, в том числе короткие пептиды, эпитопы, свернутые белковые домены, теги для нехроматографического выделения, а также сложные многофункциональные теги с оптимизированными возможностями. Генно-инженерные теги способствуют эффективной очистке рекомбинантных белков с высоким выходом и достижением значительной чистоты за несколько стандартных этапов выделения. Хотя для удаления тегов из целевого продукта по-прежнему широко используется отщепление с помощью протеаз, более удобной альтернативой становятся новые методы самоотщепления. В настоящем обзоре обсуждаются современные тенденции в выделении и очистке рекомбинантных белков с помощью технологии тегов, а также основные проблемы данной области.

Ключевые слова: рекомбинантные белки, выделение и очистка, теги

Для цитирования: Мазурина Е.М., Платонов М.Е., Трунякова А.С., Дентовская С.В. Аффинные теги для очистки рекомбинантных белков. Бактериология. 2022; 7(1): 47–54. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-47-54

Affinity tags for recombinant protein purification

E.M.Mazurina, M.E.Platonov, A.S.Trunyakova, S.V.Dentovskaya

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

To the present, many different protein purification tags have been developed, including short peptides, epitopes, folded protein domains, non-chromatographic selection tags, and complex multi-functional tags with optimized capabilities. Genetically engineered tags facilitate the efficient purification of recombinant proteins with high yields and achieving significant purity in a few standard isolation steps. Although protease-assisted cleavage is still widely used to remove tags from the target product, newer self-cleavage methods are emerging as a more convenient alternative. This review discusses current trends in the isolation and purification of recombinant proteins using tag technology, as well as the main problems in this area.

Key words: recombinant proteins, protein purification, affinity tags

For citation: Mazurina E.M., Platonov M.E., Trunyakova A.S., Dentovskaya S.V. Affinity tags for recombinant protein purification. Bacteriology. 2022; 7(1): 47–54. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-47-54

Несмотря на множество областей практического применения слитых генетических конструкций, наиболее распространенным, возможно, является использование тегов для стандартизации очистки белков-мишеней [1]. Теги обычно слиты с N- или C-концом целевого белка и позволяют селективно захватывать и выделять белок-партнер посредством образования ассоциации со специфической аффинной смолой, а также путем высокоселективной тег-зависимой преципитации или агрегации (рис. 1). Многие теги также выполняют дополнительные, не связанные с очисткой функции, такие как облегчение обнаружения целе-

вого белка или улучшение его растворимости [2]. В случаях, когда требуется получить нативный немаркированный белок, тег обычно удаляют после очистки мишени с помощью различных методов.

Хотя методы на основе тегов используются в лабораториях по всему миру в течение десятилетий, до настоящего времени еще не идентифицированы универсальные теги, применимые к любому белку, экспрессируемому в любом хозяине.

В большинстве случаев идентификация оптимального тега для данной комбинации хозяин–мишень идет путем проб и ошибок, а для некоторых целевых белков не обнару-

Для корреспонденции:

Мазурина Елизавета Михайловна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0117
E-mail: elizavetamazurina99@yandex.ru

Статья поступила 16.02.2022 г., принята к печати 30.03.2022 г.

For correspondence:

Elizaveta M. Mazurina, Junior Researcher of Laboratory For Plague Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: SRCAMB, 142279, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0117
E-mail: elizavetamazurina99@yandex.ru

The article was received 16.02.2022, accepted for publication 30.03.2022

жили эффективных тегов. Указанные ограничения способствуют продолжению разработок, которые в последние несколько лет привели к эффективным инновациям. Хотя, вероятно, создание универсальной стратегии очистки нереалистично, сохраняется необходимость расширения спектра белков, которые могут быть очищены с помощью тегов, при одновременном упрощении выбора подходящего метода для каждой новой мишени. Для достижения этих целей исследователи все чаще используют составные теги, включающие несколько небольших доменов, продолжая при этом разрабатывать однодоменные теги с расширенными возможностями. Многие новые теги при выделении белка способны прикрепляться к недорогим субстратам, что наряду с разработкой подходов по их удалению ведет к росту экономичности процесса. Все это обеспечивает повышение экспрессии, чистоты и упрощение обнаружения широкого диапазона слитых продуктов, а также удешевление удаления тегов с помощью простого самоотщепления или обычных протеолитических методов. В настоящем обзоре обсуждаются основные классы тегов, созданных для выделения и очистки рекомбинантных белков, и рассмотрены основные направления их дальнейшей разработки (таблица).

Популярные теги

Несомненно, наиболее часто для очистки белков используют полигистидин-тег (His_n-тег) [3], основными преимуществами которого являются небольшой размер, дешевизна использования и минимальное влияние на структуру и функцию целевого белка либо отсутствие всякого влияния [4]. Небольшой размер тега позволяет добавлять его к любому концу целевого белка, для его функционирования не требуется специфическая

складка, что повышает надежность тега для всех основных систем экспрессии. Несколько коммерческих векторов экспрессии доступны для белков с His-тегами. Для обнаружения подобных белков с помощью иммуноанализа существуют анти-His-антитела. Кроме того, His-тег может функционировать в нативных или денатурирующих условиях, что позволяет использовать его в протоколах рефолдинга белков [5]. His-тег успешно применяют при очистке растворимых мембранных белков, которые стабилизируются липидами или детергентами [6–8]. Действительно, уникальное сочетание силы и надежности сделало His-тег повсеместно используемым в исследованиях, не требующих экспрессии или очистки нативного немаркированного белкового продукта.

Несмотря на преимущества, использование His-тегов имеет и ряд ограничений, наиболее значимым из которых является возможность совместного выделения белков-загрязнителей с белками-мишенями, меченными остатками полигистидина.

Удаление загрязняющих веществ требует значительной оптимизации процесса выделения [9]. Недавно сконструированный штамм *Escherichia coli* LOBSTR (Low Background Strain) успешно используют для устранения из целевого продукта наиболее распространенных загрязняющих белков клетки-хозяина [10]. В некоторых случаях His-тег может мешать правильному фолдингу и активности целевого белка [11–13] и несовместим с секрецией в экспрессирующих клетках *Streptomyces* [14]. Кроме того, His-тег, как правило, не обеспечивает правильного фолдинга нерастворимых белков, поэтому его обычно добавляют к доменам, увеличивающим растворимость.

Некоторые из проблем, связанных с His-тегами, можно решить за счет использования небольших эпитопных тегов,

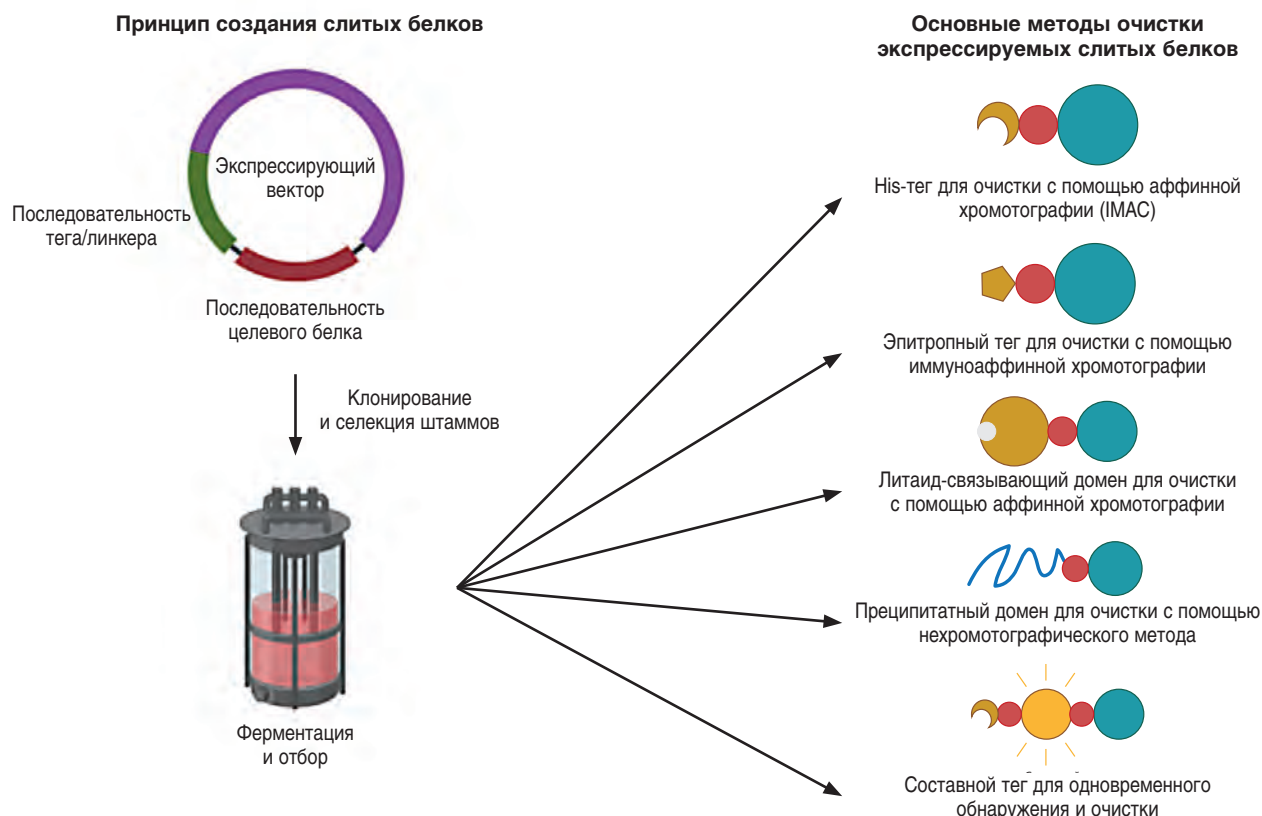








Рис. 1. Схематическое изображение основных стратегий клонирования рекомбинантных белков и часто используемых способов очистки.

наиболее широко признанными из которых являются FLAG, с-Мус и HA [15, 16]. Размер этих тегов обычно составляет 8–12 аминокислот, они прочно и специфично связываются с соответствующими иммуноаффинными смолами [17]. Небольшой размер позволяет им сохранять многие преимущества His-тега, обеспечивая при этом превосходную чистоту и извлечение слитой мишени. Теги также совместимы практически с любым хозяином для экспрессии и обеспечивают обнаружение с помощью иммуноаффинных методов с высокой чувствительностью, что делает их особенно привлекательными в случаях, когда трудно добиться повышения экспрессии целевого белка и удаление тега не требуется [18–20]. Несомненно, наиболее значительным недостатком использования небольших эпитопных тегов является высокая стоимость, поскольку коммерчески доступные иммуноаффинные смолы на несколько порядков дороже, чем большинство аффинных смол на основе лигандов. Таким образом,

удобство и селективность этих тегов делают их отличным выбором для очень узкой области применения, таких как тандемная аффинная очистка и некоторые структурные исследования. Однако для крупномасштабных экспериментов они достаточно дороги.

Третий основной класс обычных аффинных тегов включает теги лиганд-связывающего домена. Эти теги обычно намного больше, чем His-теги и эпитоп-теги, и состоят из полностью свернутых белковых доменов с высокоспецифичным сродством к низкомолекулярным лигандам, иммобилизованным на коммерчески доступных аффинных смолах. Двумя наиболее широко известными и часто используемыми тегами являются мальтозо-связывающий домен (Maltose Binding Domain/MBD) и глутатион-S-трансфераза (Glutathion S-Transferase/GST), которые не только усиливают экспрессию в микробных организмах-хозяевах, но также могут увеличивать растворимость белков-партнеров по слиянию [1,

Таблица. Основные классы тегов, используемых для выделения и очистки рекомбинантных белков

Тип тега	Пример	Преимущества	Ограничения	Ссылки
 His-тег	His _n	Минимальное влияние на экспрессию и сворачивание целевого белка; доступность коммерческих систем; хорошо зарекомендовал себя за время использования	Возможность совместной очистки загрязняющих веществ; может оказывать влияние на целевую функцию белка	[1, 3, 10, 28, 43, 63–66]
 Эпитопный тег	FLAG с-Мус GM-CSF Twin StrepII	Минимальное воздействие на целевой белок; исключительная чистота; кодируется праймером для ПЦП; обеспечивает иммунодетекцию	Очень дорогие смолы; ограниченность повторного использования	[15, 67] [15] [68] [69]
 Лиганд-связывающий домен	MBP GST Крахмал Фторопатит Диатомит βGRP	Может повысить растворимость целевого белка; обеспечивает высокоспецифичное связывание; менее дорогие смолы; возможно расщепление на колонке	Может снизить выход экспрессии; может выщелачиваться из колонки	[4, 45, 70] [4, 64] [35] [36] [38] [37]
 Преципитатный домен	ELP RTX ELK16 Fh8 4AaCter PagP	Недороги в использовании; нехроматографический метод выделения; высокие результаты экспрессии с тегами агрегации	Теги с преципитирующим доменом обычно имеют большой размер; для тегов, используемых для агрегации, могут потребоваться протоколы рефолдинга белков	[58, 59, 71, 72] [73] [74,75] [76] [77] [78, 79]
 Составной тег для обнаружения и очистки	eGFP Neme PYP	Прямое визуальное наблюдение за целевым белком; может быть очень количественным; отлично подходит для выявления неисправностей	Теги большего размера могут мешать экспрессии	[9, 80] [32, 49] [33]
 Тег растворимости и связывания	NusA SUMO Trx XTEN FATT	Могут повысить растворимость мишени во время экспрессии; может помочь в рефолдинге мишени при необходимости	Большинство из них имеют большие размеры и могут снизить целевой выход	[15, 22] [24-27, 28, 31] [47, 48, 81] [82] [39]

His_n – полигистидин; MBP – maltose-binding protein; GST – glutathione S-transferase-tag; FLAG-tag (8 amino acids); GM-CSF – granulocyte and macrophage-colony stimulating factor; βGRP – β-1,3-glucan recognition protein; ELP – elastin-like protein; RTX – repeat-in-toxin; ELK16 – self-assembling peptide; PagP – β-barrel membrane protein; eGFP – green fluorescent protein; PYP – photoactive yellow protein; NusA – hydrophilic tags, such as transcription termination anti-termination factor; SUMO – small ubiquitin like modifier protein; Trx – thioredoxin; FATT – flag-acidic-target.

21]. Существенными недостатками этих тегов являются их относительно большой размер и, как следствие, воздействие на целевые белки, что иногда требует их удаления. Данные теги также могут снизить общий выход более мелких белков-партнеров из-за высоких метаболических требований при синтезе белка.

Некоторые теги не применяют напрямую в каких-либо методах очистки, но обеспечивают улучшение фолдинга или обнаружение целевого белка. Например, слияние с NusA может повысить растворимость мишени [22], тогда как слияние с тиредоксином (thioredoxin/Trx) может способствовать образованию правильных дисульфидных связей в белках с множественными остатками цистеина [23]. Тег SUMO (small ubiquitin-related modifier – малый модификатор, связанный с убиквитином) также используют для повышения экспрессии и фолдинга рекомбинантных белков в прокариотических и эукариотических хозяевах [24–26]. Тег SUMO особенно привлекателен из-за своего небольшого размера и доступности высокоспецифичной протеазы SUMO для его удаления, и по этим причинам его часто комбинируют с рядом традиционных тегов в различных конфигурациях [27–31]. В то время как некоторые из тегов улучшают экспрессию слитых белков-партнеров, другие обеспечивают прямое визуальное отслеживание целевого белка во время экспрессии и очистки. Например, небольшие гемсвязывающие белки и мотивы придают слитой мишени ярко-красный цвет [32]. В этих же целях используют флуоресцентные и хромогенные белки [33, 34]. Хотя эти теги не всегда способствуют очистке целевого продукта, они часто помогают в устранении неполадок и оптимизации всего процесса.

Теги для очистки, фолдинга и детекции

Существуют теги, разработанные для недорогих субстратов, которые можно использовать при нехроматографических условиях, что делает их экономичными для крупномасштабных методов выделения в простых лабораторных условиях. Одним из наиболее многообещающих является крахмал-связывающий домен-тег (starch-binding domain/SBD), прочно и специфично связывающийся с сырым кукурузным крахмалом, а также с множеством других растительных крахмалов [35]. По сравнению с His-тегом SBD-тег позволяет получить высокоочищенный белок за одну стадию аффинной очистки, основанной на простом центрифугировании. Кроме того, крахмал недорогой, возобновляемый и биоразлагаемый, что предполагает использование этого метода для различных продуктов в больших масштабах.

Недавно были разработаны три дополнительных тега, которые связываются с недорогими аффинными субстратами. К ним относятся гептамерный тег, связывающийся с керамическим фторапатитом [36], состоящий из 112 аминокислотных остатков белок узнавания β -1,3-глюкана тутового шелкопряда, который связывается с недорогим курдланом [37], и 70-аминокислотный сегмент рибосомного белка L2 *E. coli*, который связывается с диатомовой землей [38]. Все три тега продемонстрировали эффективность, аналогичную обычным тегам при получении чистых белковых продуктов, и могут использоваться с недорогими базовыми материалами. Этот аспект не только способствует более низкой цене аффинных субстратов, но также устраняет риск вымывания лигандов из смолы в очищенный целевой белок.

Особое внимание привлекает тег Flag-Acidic-Target/FATT [39], состоящий из модуля тега Flag, опосредующего легкое обнаружение, вместе с гиперацидным сегментом внеклеточной области белка-предшественника амилоида человека (amyloid precursor protein/APP). Гиперацидный сегмент хорошо экспрессируется в *E. coli* и, благодаря высокому заряду, может быть легко очищен в одну стадию на обычной смоле для анионообменной хроматографии. Кроме того, было показано, что данный тег способствует правильному фолдингу слитых белков-мишеней во время экспрессии и может обеспечить правильный рефолдинг неправильно свернутых белков, содержащих дисульфидные связи. Предполагается, что эти возможности обеспечиваются неупорядоченной структурой гиперацидного сегмента FATT, который действует как цитообразный неспецифический шаперон для целевого белка во время экспрессии или рефолдинга *in vitro*.

Составные теги

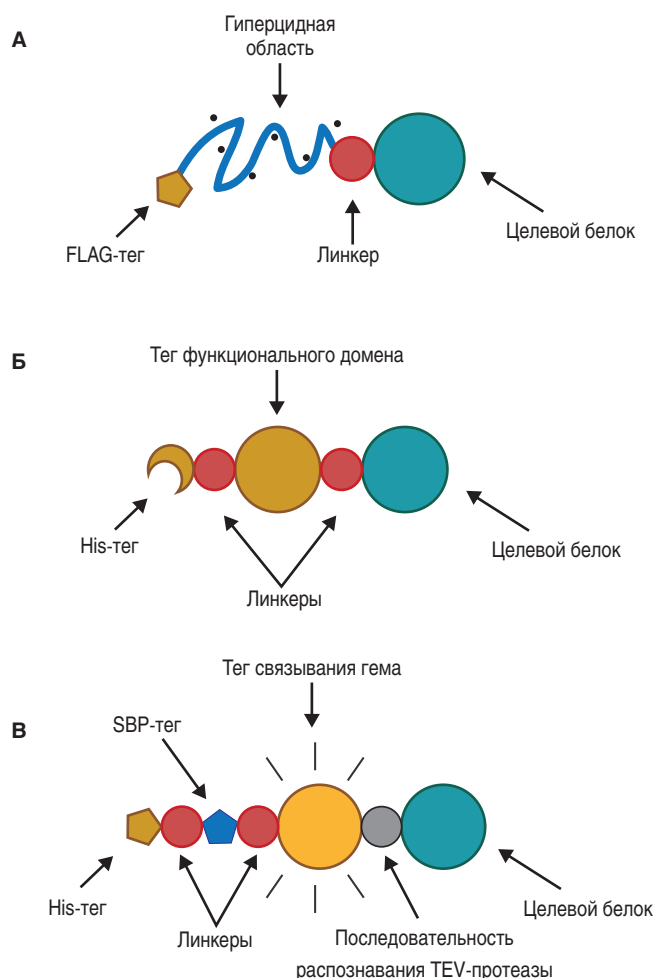


Рис. 2. Строение некоторых составных тегов. А – FATT-тег, состоящий из FLAG-тега для простого обнаружения и гиперацидного сегмента белка-предшественника амилоида человека [39]; Б – многофункциональный белок, меченный His, который включает дополнительный домен для улучшения экспрессии или количественного обнаружения. По крайней мере в одном случае His-метка используется главным образом как способ легкого удаления расщепленного функционального домена после очистки мишени; В – «Мультитег», который объединяет две метки для очистки с удобным доменом для обнаружения и последовательностью распознавания для протеазы [49].

Сложные составные теги в настоящее время обычно конструируются из нескольких связанных доменов, где различные комбинации могут обеспечивать высокоэффективные методы очистки, а также дополнительные функции, связанные с экспрессией и обнаружением мишени (рис. 2). Различные составные теги позволили охарактеризовать белок-белковые взаимодействия с помощью тандемной аффинной очистки (tandem affinity purification/TAP) и масс-спектрометрии [40–42], и эти мощные методы в настоящее время используются для очистки рекомбинантных белков-мишеней для структурных исследований.

Простейшим примером составного тега является комбинация тега для очистки белка, например His-тега, с функциональным доменом, таким как NusA-тег, повышающим растворимость [22]. Данный составной тег обеспечивает повышенную экспрессию и растворимость мишени, а также простой метод очистки и является типичным для первоначальной стратегии, используемой для получения неохарактеризованных мишеней в ранних этапах исследования. Дополнительные примеры бинарных меток включают CHiC-тег (His-Choline-связывающий домен – His-Choline binding domain) для двух методов очистки [43]; His-MBD для улучшенной экспрессии растворимых веществ и/или методов очистки [44, 45]; His-Trx для правильного образования дисульфидной связи и для упрощения удаления расщепленного тега Trx [46–48] и His-GFP для простого мониторинга и оптимизации экспрессии и очистки у *Saccharomyces* [9]. Более современным бинарным тегом теперь является тег SUMO, который может значительно увеличивать растворимую экспрессию целевых белков в различных хозяевах [27–30].

Последний, несколько более сложный пример – недавно опубликованный метод «Мультитег», основанный на четырехкомпонентном составном теге. В частности, этот тег включает в себя тег His₁₀, стрептавидин-связывающий пептид (streptavidin-binding peptide/SBP), гем-связывающий домен и последовательность протеазы TEV для удаления тега [49].

Теги His и SBP обеспечивают модернизированные методы очистки, а домен связывания гема позволяет просто визуальнo отслеживать и количественно определять целевой белок в процессе. Примечательно, что тег удаляется протеазой TEV, меченой SBP, таким образом удаляя тег и протеазу за одну операцию. Было показано, что эта метка эффективна для доставки высокоочищенной ДНК-полимеразы *Pfu* и белка, взаимодействующего с Myosin-VIIa и Rab (MyRIP – Myosin-VIIa and Rab-Interacting protein), и, вероятно, может иметь общее применение для дополнительных мишеней. Примечательно, что этот высокофункциональный тег имеет молекулярную массу всего 23 кДа, или чуть более половины молекулярной массы обычно используемого тега MBD.

Сочетание функции и размера делает этот тег очень привлекательным для методов среднего масштаба производства, а увеличивающаяся простота методов рекомбинантной ДНК способствует быстрому созданию прототипов новых конструкций. Что наиболее важно, растущая доступность небольших функциональных доменов неизбежно будет способствовать созданию дополнительных сложных и высокофункциональных тегов и будет продолжать увеличивать популярность составных тегов в будущем.

Методы удаления тегов

Во многих случаях теги, используемые для экспрессии и очистки целевого белка, должны быть удалены, прежде чем белок может быть охарактеризован или применен. Обычные методы включают удаление тегов путем добавления высокоспецифичных эндопептидаз, где целевая последовательность, узнаваемая эндопептидазой, встраивается в гибридный белок между тегом и мишенью [15]. Исследования базовых стратегий удаления тегов привели к нескольким недавним добавлениям, и все большей тенденцией является отщепление целевого белка на колонке непосредственно от иммобилизованного тега, часто с использованием иммобилизованной протеазы [49].

Значительные исследования были сосредоточены на идентификации более быстрых и более специфичных эндопептидаз для удаления тегов. Успешные результаты включают группу из четырех высокоспецифичных ферментов, применяемых в последовательной сборке белковых комплексов [50], а также устойчивую к детергентам протеазу вируса Западного Нила, используемую для отщепления тегов от мембранных белков, стабилизированных детергентом [51]. Особенно интересным примером является описанная глутамат-специфическая эндопептидаза из *Bacillus licheniformis* (протеаза GSE-BL – glutamate-specific endopeptidase), которая, как было показано, за 15 мин расщепляет до более чем 99% мишени в физиологических условиях [52].

Помимо новых протеолитических ферментов, в последние 20 лет используют способность к саморасщеплению [53, 54]. Первые из них основаны на самосплайсинговых интеинах, преобразующихся в саморасщепляющиеся белковые элементы [55–57]. Высокоэффективный метод очистки был создан путем объединения интеинов с тегом обратимо преципитирующегося эластиноподобного белка (elastin-like protein/ELP) [58–61]. Основные недостатки интеинов включают неконтролируемое расщепление во время экспрессии меченой мишени и необходимость в восстанавливающих агентах для запуска реакции расщепления на N-конце мишени.

Проблемы с преждевременным расщеплением интеинов были частично решены благодаря недавней разработке природных и сконструированных интеинов, которые неактивны при экспрессии в виде отдельных сегментов, но могут быть активированы после завершения протокола очистки. Особенно многообещающим воплощением этой стратегии является система сверхбыстрой очистки белка без тегов (SIRP – Split Intein Mediated Ultra-Rapid Purification of Tagless Protein), опосредованная расщепленным интеином, которая включает сборку и быстрое расщепление природного интеина DnaE *Nostoc punctiforme* в присутствии дитиотрептола [62]. Было показано, что эта система полностью устраняет преждевременное расщепление целевого белка во время экспрессии, но обеспечивает почти полное удаление тега менее чем за 30 мин при комнатной температуре после запуска реакции расщепления. Кроме того, сегмент интеина, который присоединен к белку-мишени, довольно мал и, таким образом, оказывает ограниченное влияние на растворимость и экспрессию мишени. По этим причинам этот интеин является одним из наиболее многообещающих для удаления тегов и, вероятно, впоследствии будет объединен с множеством тегов для очистки, обнаружения и экспрессии в будущих системах.

Заключение

Всесторонний обзор тегов и методов удаления тегов будет включать множество лиганд-связывающих доменов, эпитопов, тегов преципитации и агрегации, а также около дюжины различных разновидностей His-тега. Эти теги можно комбинировать с более чем дюжиной методов удаления тегов, используемых в бесчисленных механических конфигурациях на целевых белках всех форм и размеров. В конечном счете легкость, с которой можно конструировать, модифицировать, комбинировать, рекомбинировать и расщеплять теги, привела к появлению буквально тысяч потенциальных методов очистки одного белка. Тем не менее, несмотря на это огромное разнообразие, по-настоящему универсального метода тегов не разработано. Более того, многие белки и некоторые классы белков упорно сопротивляются даже самым творческим и тщательно спланированным стратегиям. Эти разочарования привели к неустанным исследованиям в этой области, где большинство открытий обеспечивают лишь постепенный прогресс по сравнению с установленными методами. Наиболее значительными достижениями последних нескольких лет, вероятно, могли бы стать широко распространенное в настоящее время использование тега SUMO для улучшения экспрессии и растворимости рекомбинантных белков, а также разработка ряда новых методов удаления тегов. Расщепление тегов на колонке стало обычным делом, и в настоящее время коммерчески доступны несколько конфигураций. Методы самоотщепляющихся тегов продолжают развиваться и обещают распространить методы аффинных тегов на крупномасштабные производственные процессы. Несколько популярных протеазных ферментов теперь можно производить в рекомбинантной *E. coli*, что существенно снижает их стоимость и увеличивает доступность. В сочетании с простыми и недорогими теггами для осаждения эти достижения обещают демократизировать использование аффинных методов очистки белков, делая их доступными для гораздо более широкого сегмента научного сообщества.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectorial program of Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература / References

- Young CL, Britton ZT, Robinson AS. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnol J*. 2012 May;7(5):620-34. DOI: 10.1002/biot.201100155
- Walls D, Loughran ST. Tagging recombinant proteins to enhance solubility and aid purification. *Methods Mol Biol*. 2011;681:151-75. DOI: 10.1007/978-1-60761-913-0_9
- Kuo WH, Chase HA. Exploiting the interactions between poly-histidine fusion tags and immobilized metal ions. *Biotechnol Lett*. 2011 Jun;33(6):1075-84. DOI: 10.1007/s10529-011-0554-3
- Lichty JJ, Malecki JL, Agnew HD, Michelson-Horowitz DJ, Tan S. Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expr Purif*. 2005 May;41(1):98-105. DOI: 10.1016/j.pep.2005.01.019
- Dashivets T, Wood N, Hergersberg C, Buchner J, Haslbeck M. Rapid matrix-assisted refolding of histidine-tagged proteins. *Chembiochem*. 2009 Mar 23;10(5):869-76. DOI: 10.1002/cbic.200800697
- Periasamy A, Shadiac N, Amalraj A, Garajová S, Nagarajan Y, Waters S, et al. Cell-free protein synthesis of membrane (1,3)- β -d-glucan (curdian) synthase: co-translational insertion in liposomes and reconstitution in nanodiscs. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Feb;1828(2):743-57. DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.10.003
- Hsu MF, Yu TF, Chou CC, Fu HY, Yang CS, Wang AH. Using *Haloarcula marismortui* bacteriorhodopsin as a fusion tag for enhancing and visible expression of integral membrane proteins in *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2013;8(2):e56363. DOI: 10.1371/journal.pone.0056363
- Carocchia KE, Estephan R, Cohen LS, Arshava B, Hauser M, Zerbe O, et al. Expression and biophysical analysis of a triple-transmembrane domain-containing fragment from a yeast G protein-coupled receptor. *Biopolymers*. 2011;96(6):757-71. DOI: 10.1002/bip.21614
- Antaloae AV, Montigny C, le Maire M, Watson KA, Sørensen TL. Optimisation of recombinant production of active human cardiac SERCA2a ATPase. *PLoS One*. 2013 Aug 12;8(8):e71842. doi: 10.1371/journal.pone.0071842.
- Andersen KR, Leksa NC, Schwartz TU. Optimized *E. coli* expression strain LOBSTR eliminates common contaminants from His-tag purification. *Proteins*. 2013 Nov;81(11):1857-61. DOI: 10.1002/prot.24364
- Fukushima M, Iiyama K, Yamashita J, Furue M, Tsuji G, Imanishi S, Mon H, Lee JM, Kusakabe T. Production of small antibacterial peptides using silkworm-baculovirus protein expression system. *Prep Biochem Biotechnol*. 2013;43(6):565-76. DOI: 10.1080/10826068.2012.762717
- Nakatani K, Ishikawa H, Aono S, Mizutani Y. Heme-binding properties of heme detoxification protein from *Plasmodium falciparum*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Oct 4;439(4):477-80. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.08.100
- Horchani H, Fendri A, Louati H, Sayari A, Gargouri Y, Verger R. Purification, biochemical and kinetic properties of recombinant *Staphylococcus aureus* lipase. *Methods Mol Biol*. 2012;861:267-82. DOI: 10.1007/978-1-61779-600-5_16
- Ayala JC, Pimienta E, Rodríguez C, Anné J, Vallín C, Milanés MT, et al. Use of Strep-tag II for rapid detection and purification of *Mycobacterium tuberculosis* recombinant antigens secreted by *Streptomyces lividans*. *J Microbiol Methods*. 2013 Sep;94(3):192-8. doi: 10.1016/j.mimet.2013.06.004
- Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003 Jan;60(5):523-33. DOI: 10.1007/s00253-002-1158-6
- Kelman Z, Yao N, O'Donnell M. *Escherichia coli* expression vectors containing a protein kinase recognition motif, His6-tag and hemagglutinin epitope. *Gene*. 1995 Dec 1;166(1):177-8. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00556-7
- Fritze CE, Anderson TR. Epitope tagging: general method for tracking recombinant proteins. *Methods Enzymol*. 2000;327:3-16. DOI: 10.1016/s0076-6879(00)27263-7
- Siegmund M, Richter F, Seifert O, Unverdorben F, Kontermann RE. Expression and purification of recombinant antibody formats and antibody fusion proteins. *Methods Mol Biol*. 2014;1131:273-95. DOI: 10.1007/978-1-62703-992-5_18
- Cheng L, Sage EH, Yan Q. SPARC fusion protein induces cellular adhesive signaling. *PLoS One*. 2013;8(1):e53202. DOI: 10.1371/journal.pone.0053202
- Stead CM, Omsland A, Beare PA, Sandoz KM, Heinzen RA. Sec-mediated secretion by *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiol*. 2013 Oct 5;13:222. DOI: 10.1186/1471-2180-13-222
- Chatterjee DK, Esposito D. Enhanced soluble protein expression using two new fusion tags. *Protein Expr Purif*. 2006 Mar;46(1):122-9. DOI: 10.1016/j.pep.2005.07.028

22. Davis GD, Elisee C, Newham DM, Harrison RG. New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*. 1999 Nov 20;65(4):382-8.
23. Tucker J, Grisshammer R. Purification of a rat neurotensin receptor expressed in *Escherichia coli*. *Biochem J*. 1996 Aug 1;317 (Pt 3)(Pt 3):891-9. DOI: 10.1042/bj3170891
24. Marblestone JG, Edavettal SC, Lim Y, Lim P, Zuo X, Butt TR. Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO. *Protein Sci*. 2006 Jan;15(1):182-9. DOI: 10.1110/ps.051812706
25. Peroutka Iii RJ, Orcutt SJ, Strickler JE, Butt TR. SUMO fusion technology for enhanced protein expression and purification in prokaryotes and eukaryotes. *Methods Mol Biol*. 2011;705:15-30. DOI: 10.1007/978-1-61737-967-3_2
26. Zuo X, Li S, Hall J, Mattern MR, Tran H, Shoo J, Tan R, Weiss SR, Butt TR. Enhanced expression and purification of membrane proteins by SUMO fusion in *Escherichia coli*. *J Struct Funct Genomics*. 2005;6(2-3):103-11. DOI: 10.1007/s10969-005-2664-4
27. Zhang J, Ma L, Zhang SQ. Expression and purification of soluble human APRIL in *Escherichia coli* using ELP-SUMO tag. *Protein Expr Purif*. 2014 Mar;95:177-81. DOI: 10.1016/j.pep.2013.12.013
28. Liew OW, Ang CX, Peh YP, Chong PC, Ng YX, Hwang LA, et al. A His6-SUMO-eXact tag for producing human prepro-urocortin 2 in *Escherichia coli* for raising monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*. 2014 Jan 31;403(1-2):37-51. DOI: 10.1016/j.jim.2013.11.015
29. Lu W, Cai X, Gu Z, Huang Y, Xia B, Cao P. Production and characterization of hirudin variant-1 by SUMO fusion technology in *E. coli*. *Mol Biotechnol*. 2013 Jan;53(1):41-8. DOI: 10.1007/s12033-012-9511-1
30. Truong L, Hevener KE, Rice AJ, Patel K, Johnson ME, Lee H. High-level expression, purification, and characterization of *Staphylococcus aureus* dihydroorotase (PyrC) as a cleavable His-SUMO fusion. *Protein Expr Purif*. 2013 Mar;88(1):98-106. DOI: 10.1016/j.pep.2012.11.018
31. Wang Z, Li N, Wang Y, Wu Y, Mu T, Zheng Y, et al. Ubiquitin-intein and SUMO2-intein fusion systems for enhanced protein production and purification. *Protein Expr Purif*. 2012 Mar;82(1):174-8. DOI: 10.1016/j.pep.2011.11.017
32. Asher WB, Bren KL. A heme fusion tag for protein affinity purification and quantification. *Protein Sci*. 2010 Oct;19(10):1830-9. DOI: 10.1002/pro.460
33. Kim Y, Ganesan P, Ihee H. High-throughput instant quantification of protein expression and purity based on photoactive yellow protein turn off/on label. *Protein Sci*. 2013 Aug;22(8):1109-17. DOI: 10.1002/pro.2286
34. Hsieh JM, Besserer GM, Madej MG, Bui HQ, Kwon S, Abramson J. Bridging the gap: a GFP-based strategy for overexpression and purification of membrane proteins with intra and extracellular C-termini. *Protein Sci*. 2010 Apr;19(4):868-80. DOI: 10.1002/pro.365
35. Guillén D, Moreno-Mendieta S, Aguilera P, Sánchez S, Farres A, Rodríguez-Sanoja R. The starch-binding domain as a tool for recombinant protein purification. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013 May;97(9):4141-8. DOI: 10.1007/s00253-013-4778-0
36. Islam T, Aguilar-Yañez JM, Simental-Martínez J, Ortiz-Alcaraz CI, Rito-Palomares M, Fernandez-Lahore M. A novel strategy for the purification of a recombinant protein using ceramic fluorapatite-binding peptides as affinity tags. *J Chromatogr A*. 2014 Apr 25;1339:26-33. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.02.079
37. Horiuchi M, Takahashi K, Kobashigawa Y, Ochiai M, Inagaki F. A low-cost affinity purification system using β -1,3-glucan recognition protein and curdlan beads. *Protein Eng Des Sel*. 2012 Aug;25(8):405-13. DOI: 10.1093/protein/gzs028
38. Li J, Zhang Y, Yang Y. Characterization of the diatomite binding domain in the ribosomal protein L2 from *E. coli* and functions as an affinity tag. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013 Mar;97(6):2541-9. DOI: 10.1007/s00253-012-4367-7
39. Sangawa T, Tabata S, Suzuki K, Saheki Y, Tanaka K, Takagi J. A multipurpose fusion tag derived from an unstructured and hyperacidic region of the amyloid precursor protein. *Protein Sci*. 2013 Jun;22(6):840-50. DOI: 10.1002/pro.2254
40. Li Y. The tandem affinity purification technology: an overview. *Biotechnol Lett*. 2011 Aug;33(8):1487-99. DOI: 10.1007/s10529-011-0592-x
41. Li Y. Commonly used tag combinations for tandem affinity purification. *Biotechnol Appl Biochem*. 2010 Feb 15;55(2):73-83. DOI: 10.1042/BA20090273
42. Xu X, Song Y, Li Y, Chang J, Zhang H, An L. The tandem affinity purification method: an efficient system for protein complex purification and protein interaction identification. *Protein Expr Purif*. 2010 Aug;72(2):149-56. DOI: 10.1016/j.pep.2010.04.009
43. Stamsás GA, Håvarstein LS, Straume D. ChiC, a new tandem affinity tag for the protein purification toolbox. *J Microbiol Methods*. 2013 Jan;92(1):59-63. DOI: 10.1016/j.mimet.2012.11.003
44. Cao H, Chapital DC, Howard OD Jr, Deterding LJ, Mason CB, Shockey JM, Klasson KT. Expression and purification of recombinant tung tree diacylglycerol acyltransferase 2. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012 Nov;96(3):711-27. DOI: 10.1007/s00253-012-3869-7
45. Li Y, Wang J, Yang J, Wan C, Wang X, Sun H. Recombinant expression, purification and characterization of antimicrobial peptide ORBK in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2014 Mar;95:182-7. DOI: 10.1016/j.pep.2013.12.011
46. Farkas D, Franzén LG, Hansson Ö. Cloning, expression and purification of the luminal domain of spinach photosystem 1 subunit PsfA functional in binding to plastocyanin and with a disulfide bridge required for folding. *Protein Expr Purif*. 2011 Aug;78(2):156-66. DOI: 10.1016/j.pep.2011.02.007
47. Nespovitaya N, Barylyuk K, Eichmann C, Zenobi R, Riek R. The production of recombinant (15)N, (13)C-labelled somatostatin 14 for NMR spectroscopy. *Protein Expr Purif*. 2014 Jul;99:78-86. DOI: 10.1016/j.pep.2014.03.011
48. Wu M, Zhao L, Zhu L, Chen Z, Li H. Expression and purification of chimeric peptide comprising EGFR B-cell epitope and measles virus fusion protein T-cell epitope in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2013 Mar;88(1):7-12. DOI: 10.1016/j.pep.2012.11.010
49. Miladi B, Dridi C, El Marjou A, Boeuf G, Bouallagui H, Dufour F, Di Martino P, Elm'selmi A. An improved strategy for easy process monitoring and advanced purification of recombinant proteins. *Mol Biotechnol*. 2013 Nov;55(3):227-35. DOI: 10.1007/s12033-013-9673-5
50. Frey S, Görlich D. Purification of protein complexes of defined subunit stoichiometry using a set of orthogonal, tag-cleaving proteases. *J Chromatogr A*. 2014 Apr 11;1337:106-15. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.02.030
51. Huang Q, Li Q, Chen AS, Kang C. West Nile virus protease activity in detergent solutions and application for affinity tag removal. *Anal Biochem*. 2013 Apr 1;435(1):44-6. DOI: 10.1016/j.ab.2012.12.015
52. Ye W, Wang H, Ma Y, Luo X, Zhang W, Wang J, Wang X. Characterization of the glutamate-specific endopeptidase from *Bacillus licheniformis* expressed in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. 2013 Oct 10;168(1):40-5. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.08.009
53. Li Y. Self-cleaving fusion tags for recombinant protein production. *Biotechnol Lett*. 2011 May;33(5):869-81. DOI: 10.1007/s10529-011-0533-8
54. Wood DW. Non-chromatographic recombinant protein purification by self-cleaving purification tags. *Separation Science and Technology*. 2010;45(15):2245-57.
55. Southworth MW, Amaya K, Evans TC, Xu MQ, Perler FB. Purification of proteins fused to either the amino or carboxy terminus of the *Mycobacterium xenopi* gyrase A intein. *Biotechniques*. 1999 Jul;27(1):110-4, 116, 118-20. DOI: 10.2144/99271st04
56. Wood DW, Wu W, Belfort G, Derbyshire V, Belfort M. A genetic system yields self-cleaving inteins for bioseparations. *Nat Biotechnol*. 1999 Sep;17(9):889-92. DOI: 10.1038/12879
57. Chong S, Mersha FB, Comb DG, Scott ME, Landry D, Vence LM, et al. Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene*. 1997 Jun 19;192(2):271-81. DOI: 10.1016/s0378-1119(97)00105-4

58. Shi C, Meng Q, Wood DW. A dual ELP-tagged split intein system for non-chromatographic recombinant protein purification. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013 Jan;97(2):829-35. DOI: 10.1007/s00253-012-4601-3
59. Liu F, Tsai SL, Madan B, Chen W. Engineering a high-affinity scaffold for non-chromatographic protein purification via intein-mediated cleavage. *Biotechnol Bioeng*. 2012 Nov;109(11):2829-35. DOI: 10.1002/bit.24545
60. Tian L, Sun SS. A cost-effective ELP-intein coupling system for recombinant protein purification from plant production platform. *PLoS One*. 2011;6(8):e24183. DOI: 10.1371/journal.pone.0024183
61. Banki MR, Feng L, Wood DW. Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags. *Nat Methods*. 2005 Sep;2(9):659-61. DOI: 10.1038/nmeth787
62. Guan D, Ramirez M, Chen Z. Split intein mediated ultra-rapid purification of tagless protein (SIRP). *Biotechnol Bioeng*. 2013 Sep;110(9):2471-81. DOI: 10.1002/bit.24913
63. Nishimura Y, Takeda K, Ishii J, Ogino C, Kondo A. An affinity chromatography method used to purify His-tag-displaying bio-nanocapsules. *J Virol Methods*. 2013 May;189(2):393-6. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.03.008
64. Maity R, Pauty J, Krietsch J, Buisson R, Genois MM, Masson JY. GST-His purification: a two-step affinity purification protocol yielding full-length purified proteins. *J Vis Exp*. 2013 Oct 29;(80):e50320. DOI: 10.3791/50320
65. Kimple ME, Brill AL, Pasker RL. Overview of affinity tags for protein purification. *Curr Protoc Protein Sci*. 2013 Sep 24;73:9.9.1-9.9.23. DOI: 10.1002/0471140864.ps0909s73
66. Randolph TW. The two faces of His-tag: immune response versus ease of protein purification. *Biotechnol J*. 2012 Jan;7(1):18-9. DOI: 10.1002/biot.201100459
67. Schmidt PM, Sparrow LG, Attwood RM, Xiao X, Adams TE, McKimm-Breschkin JL. Taking down the FLAG! How insect cell expression challenges an established tag-system. *PLoS One*. 2012;7(6):e37779. DOI: 10.1371/journal.pone.0037779
68. Perotti N, Etcheverrigaray M, Kratje R, Oggero M. A versatile ionic strength sensitive tag from a human GM-CSF-derived linear epitope. *Protein Expr Purif*. 2013 Sep;91(1):10-9. DOI: 10.1016/j.pep.2013.06.009
69. Schmidt TG, Batz L, Bonet L, Carl U, Holzapfel G, Kiem K, et al. Development of the Twin-Strep-tag® and its application for purification of recombinant proteins from cell culture supernatants. *Protein Expr Purif*. 2013 Nov;92(1):54-61. doi: 10.1016/j.pep.2013.08.021
70. Salema V, Fernández LÁ. High yield purification of nanobodies from the periplasm of *E. coli* as fusions with the maltose binding protein. *Protein Expr Purif*. 2013 Sep;91(1):42-8. DOI: 10.1016/j.pep.2013.07.001
71. Hassouneh W, MacEwan SR, Chilkoiti A. Fusions of elastin-like polypeptides to pharmaceutical proteins. *Methods Enzymol*. 2012;502:215-37. DOI: 10.1016/B978-0-12-416039-2.00024-0
72. Meyer DE, Chilkoiti A. Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides. *Nat Biotechnol*. 1999 Nov;17(11):1112-5. DOI: 10.1038/15100
73. Shur O, Dooley K, Blenner M, Baltimore M, Banta S. A designed, phase changing RTX-based peptide for efficient bioseparations. *Biotechniques*. 2013 Apr;54(4):197-8, 200, 202, 204, 206. DOI: 10.2144/000114010
74. Xing L, Xu W, Zhou B, Chen Y, Lin Z. Facile expression and purification of the antimicrobial peptide histatin 1 with a cleavable self-aggregating tag (cSAT) in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2013 Apr;88(2):248-53. DOI: 10.1016/j.pep.2013.01.012
75. Xing L, Wu W, Zhou B, Lin Z. Streamlined protein expression and purification using cleavable self-aggregating tags. *Microb Cell Fact*. 2011 Jun 2;10:42. DOI: 10.1186/1475-2859-10-42
76. Costa SJ, Almeida A, Castro A, Domingues L, Besir H. The novel Fh8 and H fusion partners for soluble protein expression in *Escherichia coli*: a comparison with the traditional gene fusion technology. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013 Aug;97(15):6779-91. DOI: 10.1007/s00253-012-4559-1
77. Hayashi M, Iwamoto S, Sato S, Sudo S, Takagi M, Sakai H, Hayakawa T. Efficient production of recombinant cystatin C using a peptide-tag, 4AaCter, that facilitates formation of insoluble protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2013 Apr;88(2):230-4. DOI: 10.1016/j.pep.2013.01.011
78. Hwang PM, Pan JS, Sykes BD. Targeted expression, purification, and cleavage of fusion proteins from inclusion bodies in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*. 2014 Jan 21;588(2):247-52. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.09.028
79. Hwang PM, Pan JS, Sykes BD. A PagP fusion protein system for the expression of intrinsically disordered proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2012 Sep;85(1):148-51. DOI: 10.1016/j.pep.2012.07.007
80. Kaldis A, Ahmad A, Reid A, McGarvey B, Brandle J, Ma S, Jevnikar A, Kohalmi SE, Menassa R. High-level production of human interleukin-10 fusions in tobacco cell suspension cultures. *Plant Biotechnol J*. 2013 Jun;11(5):535-45. DOI: 10.1111/pbi.12041
81. Li Y. A novel protocol for the production of recombinant LL-37 expressed as a thioredoxin fusion protein. *Protein Expr Purif*. 2012 Feb;81(2):201-10. DOI: 10.1016/j.pep.2011.10.011
82. Haeckel A, Appler F, Figge L, Kratz H, Lukas M, Michel R, Schnorr J, Zille M, Hamm B, Schellenberger E. XTEN-annexin A5: XTEN allows complete expression of long-circulating protein-based imaging probes as recombinant alternative to PEGylation. *J Nucl Med*. 2014 Mar;55(3):508-14. DOI: 10.2967/jnumed.113.128108

Информация об авторах:

Платонов Михаил Евгеньевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетической инженерии и диагностики возбудителей особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Трунякова Александра Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Дентовская Светлана Владимировна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about authors:

Mikhail E. Platonov PhD (Biological Sciences), Leading Researcher Laboratory of Genetic Engineering and Diagnosis of Causative Agents of Particularly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Alexandra S. Trunyakova, Junior Researcher of Laboratory for Plague Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Svetlana V. Dentovskaya, MD, PhD, DSc, Major Researcher of Laboratory for Plague Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор