

УДК 577.113.088.52..543.51..616

# Прямое МАЛДИ масс-спектрометрическое профилирование бактериальных белков для индикации и характеристики патогенов

Е. Н. Ильина

Научно-исследовательский институт Физико-химической медицины Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию  
e-mail: ilinaEN@gmail.com

**РЕФЕРАТ** Настоящая работа посвящена изучению возможностей и ограничений прямого МАЛДИ (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация) масс-спектрометрического профилирования бактериальных белков для исследования микробных популяций. Оптимизирован лабораторный протокол анализа, включающий грубый лизис бактерий в растворе 50 % ацетонитрила, 2,5 % трифторуксусной кислоты и применение  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты в качестве МАЛДИ матрицы. В исследование включены два вида бактерий, традиционно относящихся к микроорганизмам с высокой пластичностью геномов. В совокупности проанализированы масс-спектры от 278 штаммов *Neisseria gonorrhoeae* и 22 штаммов *Helicobacter pylori*. Типичные МАЛДИ масс-спектры *N. gonorrhoeae* содержали около 70 пиков, 20 из которых были хорошо воспроизводимы. Хотя для 3 пиков обнаружены отличия в спектрах некоторых штаммов, в целом популяция *N. gonorrhoeae* отличалась низкой гетерогенностью. Этот факт свидетельствует в пользу перспективности использования прямого МАЛДИ масс-спектрометрического профилирования для видовой идентификации гонококка. В случае со штаммами *H. pylori* выявлена существенная вариабельность среди накопленных масс-спектров. Только 5 пиков присутствовали в более 70 % образцов и сохраняли неизменными значения масс для всех спектров. Хотя эти данные ставят под вопрос возможность адекватной видовой идентификации для *H. pylori* с помощью этого подхода, предложено его применение для штаммового типирования. Продемонстрировано наличие ассоциации между распределением МАЛДИ профилей и регионом изоляции штамма.

**Ключевые слова:** МАЛДИ масс-спектрометрия, профилирование бактерий, *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*.

## ВВЕДЕНИЕ

Современная микробиология, ее прикладные направления требуют развития новых быстрых и точных методов для идентификации клинически значимых патогенов и описания их характерологических признаков – вирулентность, чувствительность к антибиотикам, штаммовая принадлежность. Одним из активно развивающихся направлений в этой области является применение прямой МАЛДИ масс-спектрометрии для осуществления анализа бактериальных клеток. Относительная толерантность МАЛДИ к загрязнению солями и другими примесями позволяет проводить прямой масс-спектрометрический анализ содержимого микробной клетки (прямое профилиро-

вание), т.е. без фракционирования и очистки отдельных компонентов.

В общем случае метод предполагает анализ сложных смесей клеточных компонентов (белков, пептидов, липидов, нуклеиновых кислот). Однако рецептура применяемых матриц и параметры снятия масс-спектров позволяют регистрировать преимущественно белковые молекулы, что наиболее ценно: белки хорошо представлены в клетке в количественном соотношении и, вместе с тем, характеризуются определенной изменчивостью.

Возможность регистрации масс-спектров, уникальных и воспроизводимых для семейств, родов, видов и подвигов микроорганизмов, формирует основу для применения

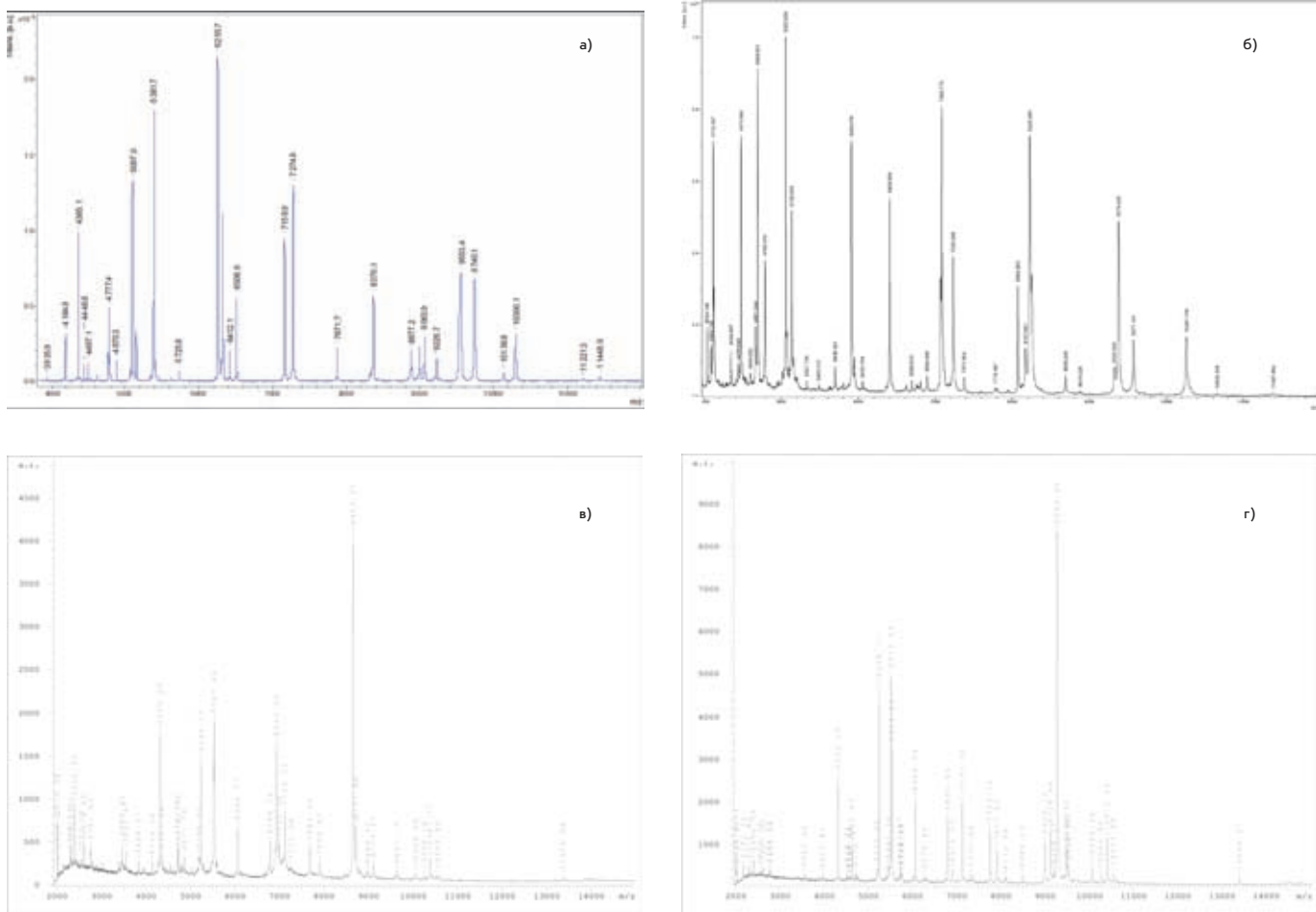


Рис. 1. МАЛДИ масс-спектры экстрактов клеток штаммов *E. coli* DH-5α (а), *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 (б), *H. pylori* J99 (в) и *H. pylori* 26695, снятые при использовании α-СНСА матрицы

масс-спектрометрии для идентификации и типирования бактерий, что впервые было показано в 1975 г. [1]. Несмотря на то, что спектр «целой клетки» (без какого-либо разделения клеточных компонентов) отражает только небольшую часть клеточной протеомы, он достаточно хорошо характеризует таксономические особенности, что продемонстрировано для ряда бактерий [2, 3, 4, 5, 6]. Стоит отметить, что такой подход не предполагает идентификацию отдельных микробных белков, а позволяет использовать уникальный масс-профиль для характеристики микроорганизма по принципу «отпечатков пальцев» [7]. Особенности и, вместе с тем, преимуществами такого подхода перед традиционными методами являются: 1) достаточно высокая чувствительность ( $10^5$ - $10^6$  клеток, или 0.5 мкг культуры клеток), 2) простая пробоподготовка, 3) высокая скорость измерения, 4) возможность автоматизации и роботизации всех стадий исследования.

В настоящем исследовании возможности и ограничения прямого МАЛДИ масс-спектрометрического профилирования бактерий продемонстрированы для микробных популяций – *Helicobacter pylori* и *Neisseria gonorrhoeae*, которые традиционно относят к микроорганизмам с высокой

пластичностью геномов. При этом ставились задачи оценить вариабельность МАЛДИ масс-профилей, снятых по единому протоколу, внутри каждой бактериальной популяции.

#### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

**БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ШТАММЫ.** В работе использованы лабораторные штаммы *Escherichia coli* DH5α, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226, *Helicobacter pylori* J99, *Helicobacter pylori* 26695; 278 клинических штаммов *N. gonorrhoeae*, выделенных в различных регионах РФ (Москва, Санкт-Петербург, Самара, Екатеринбург, Мурманск, Иркутск); 22 клинических штамма *H. pylori*, выделенных в Монголии, Туве, Якутии и Московском регионе.

Для масс-спектрометрического анализа использовали свежие культуры, находящиеся в стационарной фазе роста, полученные по стандартным для каждого микроорганизма методикам культивирования.

#### ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ ДЛЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА.

Лизис бактериальных клеток осуществляли путем ресуспендирования культуры бактерий (одиночная колония)

в 50 мкл 50 % ацетонитрила (АЦН, Sigma-Aldrich, Германия), 2,5 % трифторуксусной кислоты (ТФУ, Sigma-Aldrich, Германия). Полученный в результате последующего центрифугирования (1 мин при 14000 об/мин) супернатант использовали для МАЛДИ масс-спектрометрического анализа. В качестве матрицы применяли  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричную кислоту ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid,  $\alpha$ -CHCA, Bruker Daltonics, Германия) в виде насыщенного раствора в смеси 50 % АЦН, 2,5 % ТФУ. Все использованные реактивы, включая воду, были аналитической чистоты или специальные для масс-спектрометрии.

**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ.** Масс-спектрометрический анализ осуществляли с помощью времяпролетного МАЛДИ масс-спектрометра MicroflexTM (Bruker Daltonics, Германия), оснащенного азотным лазером 337 нм. Все измерения проводили в линейном режиме, детектируя положительные ионы. Для накопления масс-спектров мощность лазерного излучения устанавливали на уровне минимального порогового значения, достаточного для десорбции-ионизации образца. Параметры масс-спектрометра оптимизировали для диапазона  $m/z$  от 2000 до 20000. Внешнюю калибровку проводили с использованием точных значений масс известных белков *E. coli*. Образец наносили на три ячейки планшета, для каждой из которых записывали спектр, полученный в результате суммирования 10 серий спектров по 50 импульсов лазера для каждой. Для записи, обработки и анализа масс-спектров использовали программное обеспечение фирмы Bruker Daltonics (Германия): flexControl 2.4 (Build 38) и flexAnalysis 2.4 (Build 11). Точность измерения масс составляла  $\pm 2$  Да.

**ИНТЕРПРЕТАЦИЯ МАСС-СПЕКТРОВ.** При интерпретации масс-спектров исходили из предположения, что большая часть регистрируемых пиков соответствует белковым молекулам, а определяемые массы – массам целых (не фрагментированных) белков. Идентификацию белков проводили путем поиска совпадения значений экспериментальных масс с массами белков, аннотированных в соответствующих базах данных (SwissProt/TrEMBL) с использованием ресурсов ExPASy-сервера (<http://ca.expasy.org/srs5/>). При вводе параметра «молекулярный вес» использовали экспериментальное значение массы, измеряемое с точностью  $\pm 2$  Да. В случае неудачи проводили повторный поиск со значением массы, соответствующим утрате N-концевого метионина, учитывая возможность посттрансляционной модификации белков.

**СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ.** Для формирования промежуточных таблиц, осуществления элементарных расчетов, описательной статистики, построения диаграмм использовали программные ресурсы пакета Microsoft Office Excel 2003. Кластерный анализ производили с помощью программного пакета Statistica 6.0.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Протокол прямого МАЛДИ масс-спектрометрического профилирования бактерий оптимизирован с использованием лабораторного штамма *E. coli* DH5 $\alpha$ , что обусловлено имеющейся массивной информацией о белковых и нуклеотид-

ных последовательностях этого микроорганизма. За основу метода взят кислотный лизис бактериальных клеток, при котором наиболее полно экстрагируются основные рибосомальные белки, составляющие 20 % от общего пула белков *E. coli* [8].

В ходе проведенных экспериментов для получения клеточного лизата протестированы смеси растворителей с различными концентрациями и соотношениями АЦН и ТФУ, а также проанализированы три наиболее распространенные матрицы, используемые для ионизации образца в МАЛДИ масс-спектрометрии. Критериями оценки в данном случае являлись воспроизводимость МАЛДИ масс-профилей внутри одного штамма, разрешение пиков масс-спектра, соотношение сигнала к шуму, число пиков (представленность масс-спектра), их интенсивность и диапазон значений масса/заряд ( $m/z$ ), регистрируемых в ходе анализа. На основании экспериментальных данных для дальнейших этапов исследования выбран оптимальный раствор для лизиса бактериальных клеток (50 % АЦН, 2,5 % ТФУ), позволяющий получить наиболее качественные масс-спектры при использовании любого матричного вещества, включенного в исследование.

Подобранные условия прямого МАЛДИ масс-спектрометрического профилирования позволили полу-

Табл. 1. Перечень максимально воспроизводимых пиков масс-спектра лабораторного штамма *N. gonorrhoeae* ATCC 49226. Жирным шрифтом выделены пики, предположительно соответствующие рибосомальным белкам

№	M (m/z)	M <sup>1</sup> (Да)	Тип иона <sup>2</sup>	Описание
1	4474	4473	M+H <sup>+</sup>	RL36
2	4511			
3	4689	9377 <sup>3</sup>	M+2H <sup>+</sup>	RS20
4	4784	9570	M+2H <sup>+</sup>	RL27
5	5010			
6	5052	5051	M+H <sup>+</sup>	RL34
7	5130	10259 <sup>3</sup>	M+2H <sup>+</sup>	RS19
8	5484			
9	5908	5907	M+H <sup>+</sup>	RL33
10	5946			
11	6053			
12	6404	6402 <sup>2</sup>	M+H <sup>+</sup>	RL32
13	7080	7078	M+H <sup>+</sup>	RL29
14	7227	7226 <sup>3</sup>	M+H <sup>+</sup>	RL35
15	8068			
16	8167	8165	M+H <sup>+</sup>	RL31
17	8225	8224 <sup>3</sup>	M+H <sup>+</sup>	RS21
18	9379	9377 <sup>3</sup>	M+H <sup>+</sup>	RS20
19	9570	9568 <sup>3</sup>	M+H <sup>+</sup>	RL27
20	10260	10259 <sup>3</sup>	M+H <sup>+</sup>	RS19

<sup>1</sup> – масса белка, аннотированная в базах данных SwissProt/TrEMBL.  
<sup>2</sup> – тип ионов указан только для пиков, которым поставлены в соответствие белки.  
<sup>3</sup> – указана масса белка с потерей N-концевого метионина.

чить спектр *E. coli*, качественный состав которого аналогичен спектру, полученному ранее для штамма *E. coli* K-12 [9], за исключением нескольких пиков. Это несоответствие вполне закономерно, учитывая тот факт, что нами проанализирован другой штамм *E. coli* – DH5 $\alpha$ .

Типичные МАЛДИ масс-спектры, полученные для лабораторных штаммов *E. coli* DH5 $\alpha$ , *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, *H. pylori* J99, *H. pylori* 26695 по разработанному протоколу, представлены на *рис. 1*. Хотя снятие масс-спектров осуществляли в диапазоне 2000–20000 *m/z*, визуально наиболее информативным является участок от 2000 до 12000 *m/z*. Более того, тщательный анализ масс спектров показал, что большинство пиков с *m/z* 2000–4000 соответствуют двухзарядным ионам молекул, однозарядные ионы которых регистрируются в тех же спектрах. Поэтому в дальнейшем анализе основное внимание уделялось области МАЛДИ масс-спектра в диапазоне 4000–12000 *m/z*. В целом, пик-лист, полученный для лабораторного штамма *E. coli* DH5 $\alpha$  в текущем исследовании, соответствует таковому, представленному ранее для штамма *E. coli* K-12 [9].

Для лабораторного штамма *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 при каждом измерении регистрируется около 70 пиков, из которых 20 являются хорошо воспроизводимыми. Проведенная процедура идентификации продемонстрировала соответствие 14 из этих пиков рибосомальным белкам гонококка (*табл. 1*). Аналогичные данные получены для лабораторных штаммов *H. pylori* J99 и *H. pylori* 26695 – выявлены порядка 20 воспроизводимых белков, из которых 14 соответствовали рибосомальным.

В результате сравнения спектров, полученных для двух штаммов *H. pylori* J99 и 26695, обнаружены отличия (смещение, наличие/отсутствие пиков) (*рис. 1, табл. 2*). Отличия в пиках, отнесенных к рибосомальным белкам, удалось интерпретировать, основываясь на аннотации геномов этих двух штаммов, в частности, на информацию об аминокислотной последовательности соответствующих белков (RL32, RL29, RL24, RS16), другие изменения пиков спектра объяснить на данном уровне не представлялось возможным.

Отработанная методика получения воспроизводимых МАЛДИ масс-профилей бактериальных штаммов позволила проанализировать географически неоднородные группы клинических штаммов гонококка и *H. pylori*.

Проведено МАЛДИ масс-спектрометрическое профилирование 278 клинических штаммов *N. gonorrhoeae*, выделенных в различных регионах России. По данным сравнительного анализа полученных масс-спектров (пик-листов) выявлены три пика со значениями *m/z*, равными 4473, 5051 и 8165, соответствующие рибосомальным белкам RL36, RL34 и RL31, согласно масс-спектру *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, которые меняются у ряда штаммов на 4487, 5081 и 8146 соответственно. Среди исследованной группы штаммов обнаружены четыре варианта сочетаний меняющихся значений *m/z* этих белков. Учитывая неизменность остальных значений *m/z* в спектре, выделено четыре типа МАЛДИ масс-профилей (протеотипов) гонококка. Исследованные штаммы гонококка (*n* = 278) распределились следующим образом: подавляющее большинство – 236 (84.9 %) относились к типу 1 (*m/z* 4473/5051/8165), соответствующему контрольному штамму *N. gonorrhoeae*

Рис. 2. Распределение штаммов *H. pylori*, выделенных от пациентов Мордовы (m), Тувы (t), Якутии (y) и Московского региона (mo) по результатам кластерного анализа МАЛДИ масс-профилей

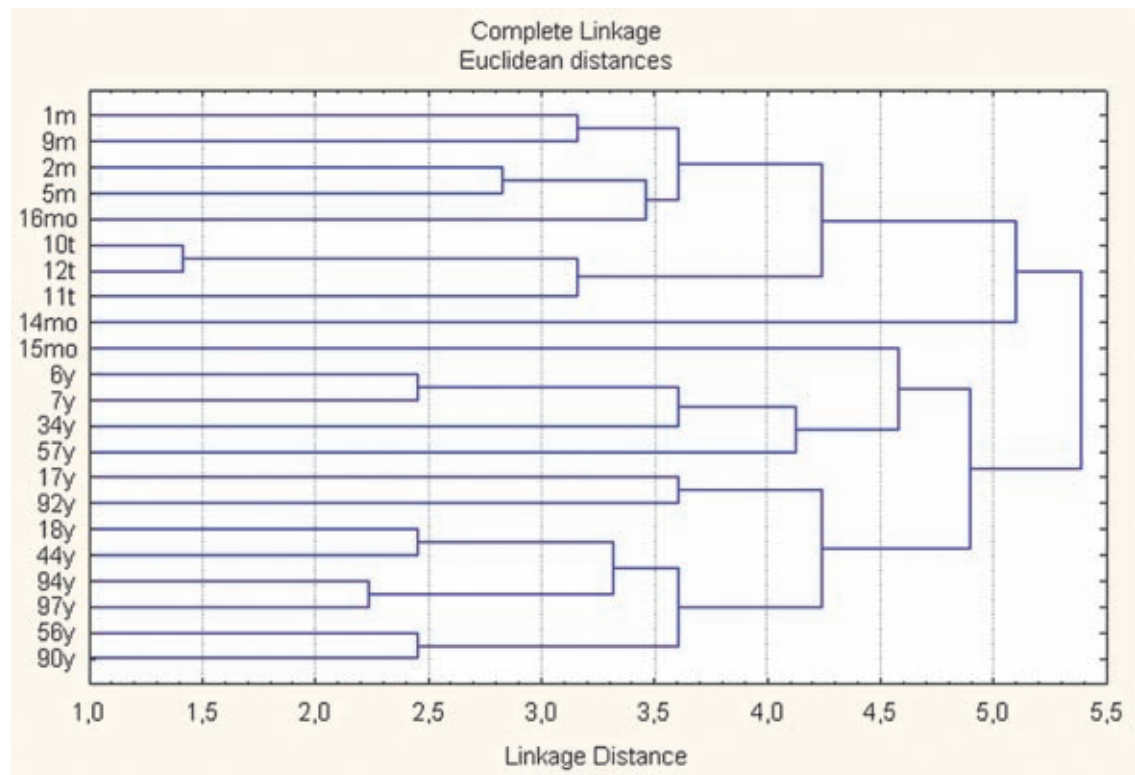


Табл. 2. Перечень максимально воспроизводимых пиков масс-спектров лабораторных штаммов *H. pylori* J99 и *H. pylori* ATCC 26695. Жирным шрифтом выделены пики, предположительно соответствующие рибосомальным белкам

H. pylori J99		H. pylori ATCC 26695		M <sup>1</sup> (Да)	Тип иона <sup>2</sup>	Описание
№	M (m/z)	№	M (m/z)			
1	4322	1	4322	4320	M+H <sup>+</sup>	RL36
2	5247	2	5247	5246	M+H <sup>+</sup>	RL34
3	5517			5515	M+H <sup>+</sup>	RL32
		3	5530	5529	M+H <sup>+</sup>	RL32
4	5541	4	5541			
5	6068	5	6068	6066	M+H <sup>+</sup>	RL33
6	6799	6	6799	6798 <sup>3</sup>	M+H <sup>+</sup>	RL28
7	6912	7	6912			
8	6947	8	6947	6946	M+H <sup>+</sup>	Hpn <sup>4</sup>
9	7130	9	7130	7129 <sup>3</sup>	M+H <sup>+</sup>	RL35
10	7654	10	7654	7652	M+H <sup>+</sup>	RL31
		11	7684	7683	M+H <sup>+</sup>	RL29
11	7753			7752	M+H <sup>+</sup>	RL29
		12	7906	7905	M+H <sup>+</sup>	RL24
12	7917			7915	M+H <sup>+</sup>	RL24
13	8484	13	8484	8482	M+H <sup>+</sup>	RS21
		14	8657			
14	8972			8971	M+H <sup>+</sup>	RS16
		15	8986	8985	M+H <sup>+</sup>	RS16
		16	9114			
15	9129					
16	10067	17	10067	10065	M+H <sup>+</sup>	RS20
17	10260	18	10260			
		19	10384			
18	10414					
19	10450	20	10450	10448	M+H <sup>+</sup>	RS18
		21	10544	10543	M+H <sup>+</sup>	RS19
20	10557					

<sup>1</sup> – масса белка, аннотированная в базах данных SwissProt/TrEMBL.  
<sup>2</sup> – тип ионов указан только для пиков, которым поставлены в соответствие белки.  
<sup>3</sup> – указана масса белка с потерей N-концевого метионина.  
<sup>4</sup> – гистидин-богатый металл-связывающий полипептид Hpn (histidine-rich, metal binding polypeptide), про который известно, что он связывает Ni<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup>, однако его функция в жизнедеятельности бактериальной клетки остается неясной [14].

ATCC 49226, 26 штаммов (9.4 %) были отнесены к типу 2 (m/z 4487/5051/8165), 15 штаммов (5.4 %) к типу 3 (m/z 4487/5051/8147) и 1 штамм из Иркутска (0.4 %) – к типу 4. Индекс разнообразия Симпсона [10] для типирования прямым масс-спектрометрическим профилированием коллекции штаммов гонококка составил 0.27.

Проведено типирование 22 клинических изолятов *H. pylori*, выделенных в разных регионах России (Якутия, Тува, Мордовия, Московская область). Сравнительный

анализ полученных масс-спектров между собой выявил большое количество вариаций и отличий. Основываясь на предположении о том, что регистрируемые смещения пиков – изменения значений m/z, группирующиеся вокруг некоего среднего значения, отражают изменения массы и, вероятно, структуры, одного и того же белка, можно заключить, что только 2 из 20 белков спектра сохраняют постоянную массу в исследованной группе. Тем не менее, кластерный анализ полученных пик-листов позволил сгруппировать анализируемые изоляты в три большие группы, коррелирующие с географической принадлежностью штаммов (рис. 2). Учитывая малый объем выборки (менее 30), индекс разнообразия Симпсона не вычисляли.

Осуществленное прямое МАЛДИ масс-спектрометрическое профилирование лабораторного (n = 1) и клинических (n = 278) штаммов *N. gonorrhoeae*, несмотря на богатые масс-спектры – до 70 пиков, выявило однородность получаемых профилей в исследуемой группе. Отдельно следует отметить, что в целом МАЛДИ масс-спектры, снятые для гонококка по разработанному протоколу, существенно богаче аннотированных ранее [11]. Наблюдаемые незначительные отличия качественного состава масс-спектров в группе клинических штаммов гонококка согласуются с нашим представлением о высокой консервативности рибосомальных белков.

Низкая гетерогенность качественного состава масс-спектров делает бессмысленным обсуждение возможности применения этого подхода для типирования гонококка. Однако обратная сторона этого результата – стабильность качественного состава масс-спектра – открывает перспективы для видовой идентификации возбудителя с использованием данного подхода. Сформированный маркерный масс-профиль из 20 устойчиво воспроизводимых пиков может быть использован для идентификации отдельного вида путем сравнения его с экспериментальным масс-спектром, принадлежащим неизвестному микроорганизму.

Осуществленное прямое МАЛДИ масс-спектрометрическое профилирование лабораторных (n = 2) и клинических (n = 22) штаммов *H. pylori*, наоборот, продемонстрировало существенную гетерогенность полученных масс-профилей. При этом варьировал как качественный, так и количественный состав спектров. Если для лабораторных штаммов были получены относительно богатые масс-спектры (до 30 пиков), то для ряда клинических штаммов спектры были крайне бедные – 7-13 пиков. Подобные результаты представлены и в более ранних исследованиях [12, 13], что свидетельствует о закономерности этого явления. В масс-профилях исследованных штаммов только 5 пиков сохранялись неизменными, из которых 4 предположительно соответствуют рибосомальным белкам и один – гистидин-богатому металл-связывающему полипептиду Hpn (histidine-rich, metal binding polypeptide), про который известно, что он связывает Ni<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup>, однако его функция в жизнедеятельности бактериальной клетки остается неясной [14].

Следует отметить, что наблюдаемая нами значительная изменчивость внутри вида в целом согласуется с известной отличительной особенностью хеликобактера – выраженной

макро- и микрогетерогенностью генома [15, 16, 17]. Фиксация внутривидовой гетерогенности данным методом дает основания полагать, что этот подход может быть использован для внутривидовой классификации и типирования микроорганизмов, что и было продемонстрировано с привлечением средств кластерного анализа.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Обобщение опыта применения прямого МАЛДИ масс-спектрометрического профилирования бактерий позволяет сделать вывод о возможной видовой идентификации возбудителя с использованием этого подхода, что продемонстрировано на примере анализа обширной группы клинических штаммов *N. gonorrhoeae*. Напротив, внутривидовая классификация и типирование микробов данным методом,

вероятно, мало информативны для видов с низкой внутривидовой изменчивостью.

С другой стороны, возможность идентификации бактерий, характеризующихся высокой внутривидовой изменчивостью, таких как *H. pylori*, остается неопределенной и требует дальнейшего изучения. В этом случае полученные данные демонстрируют перспективу использования прямого МАЛДИ масс-спектрометрического профилирования для штаммовой дифференцировки и типирования бактерий. ●

*Источник грантового финансирования данной работы: грант № 270505(# 30686) от компании Брукер Дальтоник (Германия).*

### Список литературы

- Byrne V, Iwata S (2002) Membrane protein complexes. *Curr Opin in Struct Biol* 12: 239-243.
- Grisshammer R, Tate CG (1995) Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Q Rev. Biophys* 28: 314-422.
- Jana S, Deb JK (2005) Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:289-298.
- Drew D, Fröderberg L, Baars L, de Gier JW (2003) Assembly and overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1610: 3-10.
- Legros C, Pollmann V, Knaus H-G, Farrell AM, Darbon H, Bougis PE, Martin-Eauclaire MF, Pongs O (2000) Generating a high-affinity scorpion toxin receptor in KcsA-Kv1.3 chimeric potassium channels. *J Biol Chem* 275: 16918-16924.
- Legros C, Schulze C, Garcia ML, Bougis PE, Martin-Eauclaire MF, Pongs O (2002) Engineering-specific pharmacological binding sites for peptidyl inhibitors of potassium channels into KcsA. *Biochemistry* 41: 15369-15375.
- Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M (2000) Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 52:557-594.
- Beeton C, Wulff H, Barbaria J, Clot-Faybesse O, Pennington M, Bernard D, Cahalan MD, Chandy KG, Béraud E (2001) Selective blockade of T lymphocyte K(+) channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13942-13947.
- Kaczorowski GJ, Garcia ML (1999) Pharmacology of voltage-gated and calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Chem Biol* 3: 448-458.
- MacKinnon R (2003) Potassium channels. *FEBS Lett* 555: 62-65.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 280: 69-77.
- MacKinnon R, Cohen SL, Kuo A, Lee A, Chait BT (1998) Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science* 280:106-109.
- Sambrook J, Fritsch EF and Mniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Irizarry SN, Kutluay E, Drews G, Hart SJ, Heginbotham L (2002) Opening the KcsA K<sup>+</sup> channel: tryptophan scanning and complementation analysis lead to mutants with altered gating. *Biochemistry* 41: 13653-13662.
- Cortes DM, Perozo E (1997) Structural dynamics of the *Streptomyces lividans* K<sup>+</sup> channel (SKC1): oligomeric stoichiometry and stability. *Biochemistry* 36: 10343-10352.
- Singh SM, Panda AK (2005) Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng* 99: 303-310.
- van Heerikhuizen H, Kwak E, van Bruggen EF, Witholt B (1975) Characterization of a low density cytoplasmic membrane subfraction isolated from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 413: 177-191.
- Schrempf H, Schmidt O, Kümmerlen R, Hinnah S, Müller D, Betzler M, Steinkamp T, Wagner R (1995) A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. *EMBO J* 14: 5170-5178
- Carlone GM, Thomas ML, Rumschlag HS, Sottnek FO (1986) Rapid microprocedure for isolating detergent-insoluble outer membrane proteins from *Haemophilus* species. *J Clin Microbiol* 24: 330-332.
- Gauthier A, Puente JL, Finlay BB (2003) Secretin of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization. *Infect Immun* 71:3310-3319.
- Fiermonte G, Walker JE, Palmieri F (1993) Abundant bacterial expression and reconstitution of an intrinsic membrane-transport protein from bovine mitochondria. *Biochem J* 294: 293-299
- Kerman A, Ananthanarayanan VS (2005) Expression and spectroscopic characterization of a large fragment of the mu-opioid receptor. *Biochim Biophys Acta* 1747:133-40
- Shimada Y, Wang ZY, Mochizuki Y, Kobayashi M, Nozawa T (2004) Functional expression and characterization of a bacterial light-harvesting membrane protein in *Escherichia coli* and cell-free synthesis systems. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:1942-1948.
- van Dalen A, Schrempf H, Killian JA, de Kruijff B (2000) Efficient membrane assembly of the KcsA potassium channel in *Escherichia coli* requires the protonmotive force. *EMBO Rep* 1:340-346.
- Nekrasova OV, Ignatova AA, Nazarova AI, Feofanov AV, Korolkova YV, Boldyreva EF, Tagveit AI, Grishin EV, Arseniev AS, Kirpichnikov MP (2008) Recombinant Kv Channels at the Membrane of *Escherichia coli* Bind Specifically Agitoxin2. *J Neuroimmune Pharmacol* DOI 10.1007/s11481-008-9116-4.
- Garcia ML, Garcia-Calvo M, Hidalgo P, Lee A, MacKinnon R (1994) Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom. *Biochemistry* 33: 6834-6839.
- Valiyaveetil FI, MacKinnon R, Muir TW (2002) Semisynthesis and folding of the potassium channel KcsA. *J Am Chem Soc* 124:9113-9120.