

УДК 577.152.232, 577.112.083, 577.151.042, 579.234, 579.873.21

Выделение, очистка и характеристика *L,D*-транспептидазы 2 *Mycobacterium tuberculosis*

С. М. Балдин^{1,2}, Т. А. Щербанова¹, В. К. Швядас^{1,2*}¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

*E-mail: vyfas@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 21.11.2016

Принята в печать 13.12.2016

РЕФЕРАТ *L,D*-транспептидаза типа 2 *Mycobacterium tuberculosis* играет ключевую роль в формировании неклассических 3-3-поперечных сшивок пептидогликана в клеточной стенке патогена, обуславливая его устойчивость к широкому спектру антибиотиков пенициллинового ряда. Нами оптимизированы условия экспрессии, выделения и очистки рекомбинантной *L,D*-транспептидазы 2 из *M. tuberculosis*. Важным фактором, вызывающим инактивацию фермента, является окисление SH-групп каталитического остатка цистеина Cys354 как в процессе экспрессии, так и при хранении препарата. Определены биохимические свойства очищенной *L,D*-транспептидазы 2 – как полной, так и без домена А, а также кинетические характеристики катализируемой ферментом реакции превращения нитроцефина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *L,D*-транспептидаза, *Mycobacterium tuberculosis*, очистка фермента, рекомбинантный фермент, реактивация фермента.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ Ac – ацетил; Ldt – *L,D*-транспептидаза; LdtMt1 и LdtMt2 – *L,D*-транспептидазы *Mycobacterium tuberculosis* первого и второго типа; m-DAP – мезо-диаминопимелиновая кислота; IG – иммуноглобулин; Amp – ампициллин; IPTG – изопропил-β-D-1-тиогактопиранозид; LEW – Lysis/Equilibration/Wash-буфер; ПААГ-электрофорез – электрофорез в полиакриламидном геле; DTT – дитиотреитол.

ВВЕДЕНИЕ

Туберкулез – опасное инфекционное заболевание, возбудителем которого является *Mycobacterium tuberculosis*. Число случаев туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью ежегодно возрастает [1]. Терапия туберкулеза заключается в комбинированном применении четырех основных препаратов первого эшелона, в который входят: рифампицин – ингибитор ДНК-зависимой РНК-полимеразы; изониазид и пиразинамид – блокаторы синтеза миколовых кислот, необходимых для формирования клеточной стенки *M. tuberculosis*; этамбутол – ингибитор арабинозилтрансферазы, фермента, участвующего в синтезе арабиногалактана. Лечение больных в активной фазе может длиться более 6 месяцев. В некоторых случаях *M. tuberculosis* может сохраняться в легких в так называемой стационарной фазе, когда рост бактерий замедлен, не наблюдается иммунного ответа и проявляется устойчивость к различным антибиотикам [2]. В этой связи

большой интерес представляет поиск лекарственных средств, действующих на ранее не известные молекулярные мишени, связанные с особенностями жизнедеятельности и структурной организацией возбудителя туберкулеза. В последнее время понятными стали особенности формирования клеточной стенки ряда опасных патогенов, в том числе *M. tuberculosis*. В то время как у большинства бактерий главную роль в синтезе поперечных сшивок в пептидогликане играют пенициллинсвязывающие ферменты *D,D*-транспептидазы, которые катализируют перенос 3-го остатка мезо-диаминопимелиновой кислоты (m-DAP) или L-Lys на 4-й остаток D-Ala (4-3-сшивки), образование большей части поперечных сшивок у *M. tuberculosis* осуществляют *L,D*-транспептидазы, катализирующие перенос 3-го остатка m-DAP на аналогичный остаток другой цепи пептидогликана (3-3-сшивки) [3, 4], содержание которых в возбудителе туберкулеза достигает 80%. Первоначально *L,D*-транспептидазы обнаружили у таких микро-

организмов, как *Escherichia coli* [5], *Bacillus subtilis* [6] и *Enterococcus faecium* [7], а о присутствии этих ферментов и их исключительной роли в формировании клеточной стенки у таких патогенов, как *M. tuberculosis* [8] и *Helicobacter pylori* [9], стало известно сравнительно недавно. Это открытие помогло понять причины низкой эффективности β -лактамных антибиотиков при туберкулезе и ряде других инфекционных заболеваний: *L,D*-транспептидазы, в отличие от *D,D*-транспептидаз, не чувствительны к широко используемым пенициллинам и цефалоспорином [10, 11]. Важность этих ферментов в функционировании микобактерий делает их одной из наиболее привлекательных мишеней для поиска ингибиторов с целью создания новых антибиотиков, обладающих противотуберкулезной активностью.

L,D-транспептидазы относятся к классу аминоксилтрансфераз [КФ 2.3.2]. Они принадлежат к суперсемейству белков с YkuD-доменами, название которому дала *L,D*-транспептидаза (YkuD-фермент) *B. subtilis* – первый фермент с известной кристаллической структурой [6]. Геном *M. tuberculosis* кодирует пять белков, содержащих доменов, обладающий *L,D*-транспептидазной активностью (участки Rv0116с, Rv0192, Rv0483, Rv1433 и Rv2518с) [11]. Наиболее активно экспрессируется *L,D*-транспептидаза второго типа (LdtMt2) [8], с которой связывают высокое содержание «неклассических» 3-3-сшивок в пептидогликане клеточной стенки патогена. Определены аминокислотные последовательности *L,D*-транспептидаз возбудителя туберкулеза, однако структуры установлены лишь у ферментов первого и второго типа (LdtMt1 и LdtMt2). Предшественник LdtMt2 состоит из 408 аминокислотных остатков, образующих сигнальный пептид (Met1–Ala34) и цепь самого фермента (Cys35–Ala408), которую можно разделить на три домена: два некаталитических IG-подобных домена А и В (остатки Ala55–Ser147 и Pro148–Gly250 соответственно), а также каталитический домен С (остатки Asp251–Ala408), обладающий транспептидазной активностью. Ключевыми для катализа остатками LdtMt2 являются Cys354, His336 и Ser337, составляющие цепь переноса протона [8]. Активный центр LdtMt2 не экспонирован непосредственно в раствор, а расположен под так называемой «крышкой» Tyr298–Trp324 [12], формирующей три канала (А, В и С), по двум из которых (В и С) возможна доставка субстрата в активный центр.

Определена структура комплекса LdtMt2 с дипептидным фрагментом (N- γ -D-глутамил-m-DAP) пептидогликана в активном центре фермента, PDB 3TUR [11], получены также структурные данные для ковалентных комплексов LdtMt2 с меропенемом и LdtMt1 с имипенемом [12, 13]. С использова-

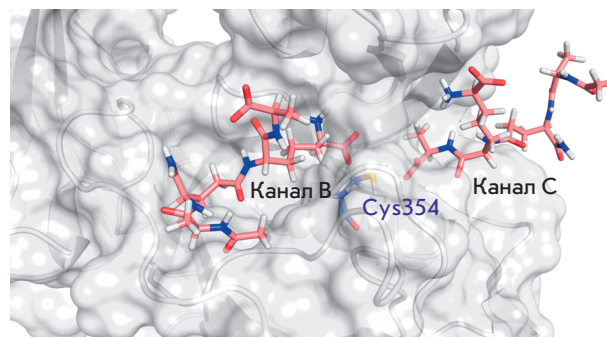


Рис. 1. Объединенные кадры из молекулярно-динамических траекторий, в которых фрагменты пептидогликана связаны с активным центром через разные каналы (В и С) [16]

нием методов предстационарной кинетики изучена инактивация LdtMt1 различными β -лактамными соединениями, такими, как меропенем, имипенем, дорипенем и эртапенем [14]. Показано [15], что эффективным ингибитором LdtMt могут быть не только карбапенемы, но и β -лактамный антибиотик пеницимидового ряда – фаропенем. Проведенное нами исследование взаимодействия фермента с тетрапептидным фрагментом пептидогликана клеточной стенки, а также с известными β -лактамными ингибиторами при помощи методов молекулярного моделирования [16] позволило выявить особенности связывания N- и C-концевых фрагментов растущей цепи пептидогликана под действием LdtMt2 при образовании поперечных 3-3-сшивок и построить адекватную полноатомную модель LdtMt2 для скрининга и оптимизации структуры ингибиторов (рис. 1). Особенность действия *L,D*-транспептидаз заключается в том, что эти ферменты связывают в активном центре две молекулы субстрата – одну в качестве ацильного донора, которая в дальнейшем образует промежуточный ацилфермент, другую – в качестве нуклеофила, которая после связывания с ацилферментом и переноса ацильной группы L-центра остатка m-DAP одной цепи пептидогликана на аминокислотную группу D-центра остатка m-DAP другой цепи формирует поперечную 3-3-сшивку пептидогликана клеточной стенки. Молекулярное моделирование показало, что связывание N-концевого фрагмента растущей цепи пептидогликана (ацильного донора), а также β -лактамных соединений, способных инактивировать фермент в результате образования стабильного ацилфермента, происходит в канале С, в то время как C-концевой (нуклеофильный) фрагмент растущей цепи связывается в канале В.

Задача данной работы состояла в выделении, очистке и характеристике LdtMt2 из *M. tuberculosis* с целью получения препаратов фермента для экспе-

риментального изучения ингибиторной способности соединений, отобранных в результате компьютерного скрининга.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспрессия LdtMt2 и LdtMt2_cut в *E. coli*, выделение и очистка

Наряду с препаратом «полноразмерной» LdtMt2 при выполнении работы был также получен препарат фермента, не содержащего в своей структуре домена А (мы назвали такой препарат LdtMt2_cut). Сравнительное изучение двух препаратов (LdtMt2 и LdtMt2_cut) могло помочь ответить на вопрос о влиянии домена А на каталитическую активность фермента. Для экспрессии фермента использовали плазмиду pET-19b, несущую либо ген *Rv2518c* (LdtMt2), не содержащий участка, кодирующего сигнальный пептид (остатки Phe54–Ala408), либо ген *Rv2518c_cut* (LdtMt2_cut), в котором отсутствовал не только участок, кодирующий сигнальный пептид, но и домен А (остатки Pro148–Ala408). В обоих случаях на N-концах белка располагался концевой пептид, состоящий из 24 аминокислотных остатков: MGNNNNNNNNHSSGHIDDDDKHM с декагистициновым концевым фрагментом (His-tag). Колонии *E. coli* BL21(DE3) с трансформированной плазмидой pET-19b выращивали в среде LB в течение ночи. В дальнейшем переносили 100 мкл полученной культуры в колбу с отбойниками со средой LB, содержащей ампициллин (Amp) в концентрации 100 мкг/мл. Среду инкубировали при 37°C и 180 об/мин в течение 6–7 ч до достижения оптической плотности 0.6–0.8 при $\lambda = 600$ нм.

Экспрессию фермента начинали, снижая температуру до 15°C и добавляя водный раствор CaCl₂ до концентрации 2 мМ, изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (IPTG) до концентрации 0.5 мМ и глицерин до 2% (по объему), и продолжали в течение 4, 24 и 48 ч. Все операции по выделению фермента проводили во льду, образцы центрифугировали при 4°C. Выделение проводили по стандартной методике использования колонок Protino Ni-TED 1000 (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co) для очистки белков, содержащих His-tag [17]. Клетки осаждали в центрифуге при 4000 об/мин и 4°C в течение 15 мин, сырую клеточную массу взвешивали, затем ресуспендировали в 3 мл LEW-буфера (50 мМ NaH₂PO₄ pH 8.0, 0.3 М NaCl), добавляли лизоцим до концентрации 1 мг/мл, инкубировали в течение 30 мин и разрушали под действием ультразвука в ледяной воде в течение 10 мин. Полученный лизат центрифугировали при 12000 об/мин в течение 30 мин при 4°C, супернатант фильтровали через 0.2-мкм фильтр и наносили

на колонку Protino Ni-TED 1000, уравновешенную 2 мл LEW-буфера. Клеточные белки смывали двумя порциями (по 2 мл) LEW-буфера, LdtMt2 элюировали тремя порциями (по 1.5 мл) буфера для элюции (50 мМ NaH₂PO₄, 0.3 М NaCl, 0.25 мМ имидазол, pH 8.0). Общую концентрацию белка и выход фермента контролировали на всех этапах очистки с использованием микробиуретового метода [18].

Определение концентрации SH-групп

Свободные SH-группы титровали, используя реактив Эллмана 5,5'-дитиобис-2-нитробензойную кислоту (DTNB) в концентрации 10 мМ (4 мг/мл) в денатурирующем буфере (0.1 М Трис-HCl, содержащем 6 М гуанидинхлорид, pH 8.0). В качестве модельного соединения для построения калибровочной прямой использовали N-ацетилцистеин (N-Ас-L-Cys). Готовили 0.2 мМ раствор N-Ас-L-Cys, в денатурирующий буфер добавляли 7 мкл реактива Эллмана в концентрации 10 мМ (4 мг/мл) и 5–55 мкл раствора N-Ас-L-Cys (2–22 мкМ), чтобы общий объем смеси составлял 500 мкл. Полученную смесь инкубировали в течение 5 мин и определяли поглощение при 412 нм. Концентрацию SH-групп рассчитывали, используя значение коэффициента экстинкции образующейся 2-нитро-5-тиобензойной кислоты при 412 нм и pH 8.0, равное 14150 М⁻¹см⁻¹ [19].

Таким же образом титровали свободные SH-группы в препаратах LdtMt2 и LdtMt2_cut. Образец объемом 62–125 мкл с известной концентрацией фермента добавляли в денатурирующий буфер с 7 мкл реактива Эллмана, чтобы конечный объем смеси составлял 500 мкл, инкубировали в течение 5 мин и определяли поглощение при 412 нм. Концентрацию SH-групп в ферменте рассчитывали аналогично N-Ас-L-Cys.

Определение активности LdtMt2 и LdtMt2_cut с использованием нитроцефина

В настоящее время низкомолекулярные аналоги фрагмента клеточной стенки, которые могли быть удобными субстратами для определения активности фермента, не известны, поэтому активность LdtMt2 и его кинетику принято изучать с использованием хромогенного субстрата нитроцефина (рис. 2) [11].

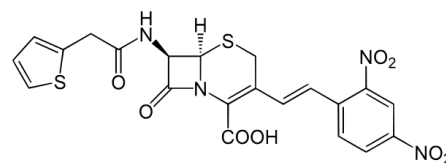


Рис. 2. Структурная формула нитроцефина – субстрата L,D-транспептидазы

Таблица 1. Результаты культивирования, выделения и очистки препаратов LdtMt2 и LdtMt2_cut

Препарат	Время экспрессии, ч	Масса клеток после центрифугирования, г	Концентрация белка в клеточных экстрактах, мг/мл	Масса очищенного фермента, мг
LdtMt2	4	–	–	1.2
	24	0.62	3.7	2.4
	48	0.86	4.1	2.4
LdtMt2_cut	4	–	–	0.8
	24	0.71	3.1	1.9
	48	0.95	3.8	1.9

Активность ферментных препаратов по отношению к нитроцефину определяли по величине абсорбции продукта гидролиза β-лактамного кольца при 486 нм в 0.02 М буфере HEPES pH 7.5 в присутствии 0.1 М KCl. Значение коэффициента экстинкции продукта принимали равным 20500 М⁻¹см⁻¹ [11].

Культивирование в восстанавливающих условиях для предотвращения инактивации фермента

Проведенные нами опыты по выделению и очистке LdtMt2 показали, что для получения активных препаратов фермента необходимо использовать восстанавливающие условия, которые препятствуют окислению каталитического остатка цистеина. С этой целью при культивировании продуцента за 3 ч до окончания экспрессии в среду добавляли дитиотреитол (DTT) до концентрации 6 мМ. Выделение фермента также проводили в присутствии DTT.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе получения препаратов LdtMt2 и LdtMt2_cut для выявления оптимальных условий по выходу целевого фермента проводили экспрессию в течение различных промежутков времени: 4, 24 и 48 ч. В табл. 1 представлены результаты выделения и очистки препаратов LdtMt2 и LdtMt2_cut. Оптимальным для препаративного выделения и очистки препаратов было культивирование в течение 24 ч: при сравнении с культивированием в течение 48 ч имеется не только выигрыш во времени, но и более высокий выход очищенного фермента по белку.

С помощью ПААГ-электрофореза показано, что посторонние белки не связываются на Ni-TED-колонках, а полученные препараты по молекулярной массе соответствуют LdtMt2 40.9 кДа (Ala55–Ala408 + His-tag) и LdtMt2_cut 31.3 кДа (Pro148–Ala408 + His-tag) и обладают высокой степенью чистоты (рис. 3). В то же время активность препарата LdtMt2, выделенного без добавления восстанавливающих агентов, по отношению к нитроцефину была существенно ниже ожидаемой.

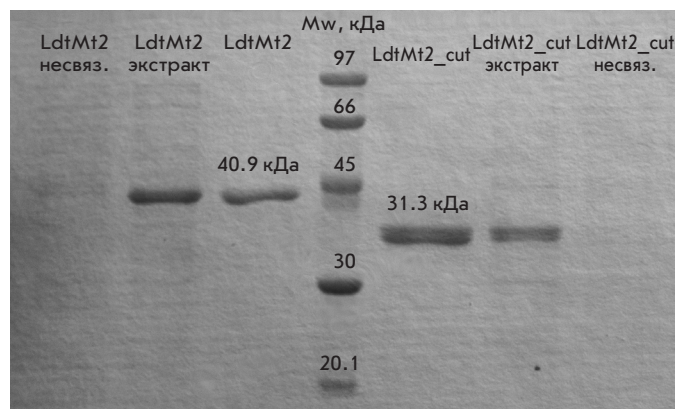


Рис. 3. ПААГ-электрофорез в денатурирующих условиях препаратов LdtMt2 40.9 кДа (Ala55–Ala408 + His-tag) и LdtMt2_cut 31.3 кДа (Pro 148–Ala408 + His-tag), очищенных на Protino Ni-TED 1000, а также клеточных экстрактов и фракций, не связавшихся со смолой

Как показано ранее [11], каталитический остаток цистеина Cys354 способен подвергаться окислению, что может приводить к необратимой инактивации LdtMt2. Когда для предотвращения окисления каталитического остатка цистеина культивирование клеток *E. coli*, а также выделение фермента проводили в восстанавливающих условиях с добавлением в среду дитиотреитола (DTT), выход белка существенно не изменился и составил 1.8 ± 0.2 мг с 50 мл культуральной среды, однако каталитическая активность фермента оказалась существенно выше. Степень окисления SH-групп в препаратах LdtMt2 и LdtMt2_cut, полученных при культивировании и выделении фермента в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях, оценивали с использованием титрования SH-групп по методу Элмана. Полученные результаты представлены в табл. 2. Добавление DTT в культуральную среду и выделение фермента в восстанавливающих условиях позволило предотвратить окисление каталитического Cys354 и получить препарат LdtMt2 с почти в 2 раза более высокой удельной активностью.

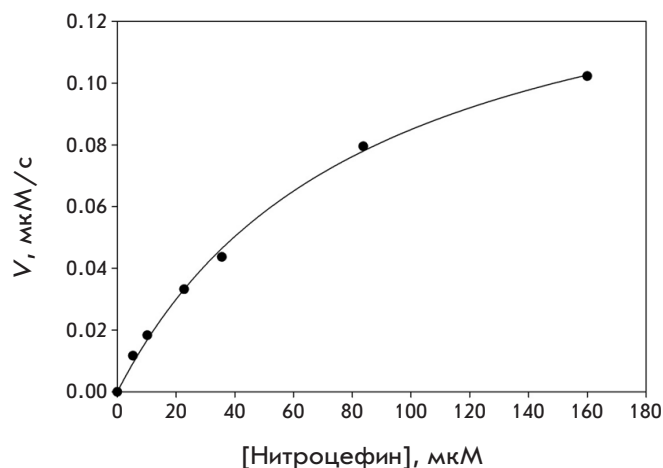


Рис. 4. Зависимость начальных скоростей катализируемой LdtMt2 реакции раскрытия β-лактамного кольца нитроцефина от концентрации нитроцефина. Точки представляют экспериментальные данные. При построении кривой использованы значения кинетических параметров, приведенные в тексте

Стоит также отметить, что очищенные препараты фермента были достаточно стабильными при хранении (4°C, pH 7.5, 20 мМ HEPES, 0.1 М KCl) и практически не теряли активности в течение месяца. Этот факт в значительной степени способствует использованию полученных ферментных препаратов для изучения их каталитических свойств и тестирования потенциальных ингибиторов.

Важной частью работы было получение ответа на вопрос о влиянии домена А на каталитическую активность фермента. Сравнение активностей LdtMt2 и LdtMt2_cut показало, что после удаления домена А удельная активность препарата полноразмерного фермента снижается более чем на порядок (см. табл. 3). Значения K_M и V_{max} реакции гидролиза нитроцефина, катализируемого LdtMt2 и LdtMt2_cut, определяли при анализе зависимости начальных скоростей от концентраций субстрата в интервале 5–160 мкМ (рис. 4). При определении значений каталитических констант ферментативной реакции и расчете концентрации активных центров фермента в препаратах LdtMt2 и LdtMt2_cut учитывали концентрацию свободных SH-групп. Падение активности полноразмерного фермента при удалении домена А в основном обусловлено снижением каталитической константы, которая при переходе от LdtMt2 к LdtMt2_cut в реакции превращения нитроцефина снижается от $0.98 \pm 0.05 \text{ с}^{-1}$ до $0.08 \pm 0.03 \text{ с}^{-1}$, в то время как значение константы Михаэлиса ухудшается незначительно – от 85 ± 7 до $102 \pm 10 \text{ мкМ}$ соответственно.

Таблица 2. Доля свободных SH-групп в препаратах LdtMt2, полученных без добавления и с добавлением 6 мМ DTT в среду во время культивирования

DTT, мМ	Доля свободных SH-групп [SH]/[LdtMt2], %
0	42 ± 2
6	72 ± 7

Таблица 3. Удельная активность препаратов LdtMt2 и LdtMt2_cut в реакции превращения нитроцефина в расчете на содержание белка в ферментном препарате и на содержание активных центров, учитывающее присутствие свободных SH-групп

Препарат	Удельная активность	
	на мг белка, мкмоль/(мин×мг)	на мкмоль SH-групп, мкмоль/(мин×мкмоль)
LdtMt2 (Ala55–Ala408)	0.65	30.6
LdtMt2_cut (Pro148–Ala408)	0.03	2.6

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенная оптимизация условий экспрессии и очистки LdtMt2 показала, что наиболее продуктивным путем получения активных ферментных препаратов является культивирование клеток *E. coli* в течение 24 ч в среде LB в присутствии 0.2 мМ IPTG, 2 мМ CaCl₂ и своевременное добавление восстанавливающих агентов (DTT) для предотвращения окисления каталитического Cys354. Получен высокоочищенный препарат LdtMt2 *M. tuberculosis*, не теряющий активности как минимум в течение месяца при хранении в буферном растворе 20 мМ HEPES, pH 7.5 при 4°C, который можно использовать для экспериментального изучения потенциальных ингибиторов фермента, отобранных в результате компьютерного скрининга. Охарактеризованы биохимические и кинетические свойства препаратов полноразмерной LdtMt2 и LdtMt2_cut без домена А. Показано, что при удалении домена А, непосредственно не связанного с каталитическим доменом С, активность полноразмерного фермента существенно снижается (более чем на порядок), в основном из-за снижения каталитической константы превращения нитроцефина. Взаимодействие между доменами и их роль в проявлении функциональных свойств полноразмерного фермента требует дальнейшего изучения. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского научного фонда (грант
№ 15-14-00069).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global tuberculosis report 2016. // World Health Organization. 2016.
2. Betts J.C., Lukey P.T., Robb L.C., McAdam R.A., Duncan K. // *Mol. Microbiol.* 2002. V. 43. № 3. P. 717–731.
3. Fisher J.F., Meroueh S.O., Mobashery S. // *Chem. Rev.* 2005. V. 105. № 2. P. 395–424.
4. Jankute M., Cox J.A.G., Harrison J., Besra G.S. // *Annu. Rev. Microbiol.* 2015. V. 69. № 1. P. 405–423.
5. Magnet S., Dubost L., Marie A., Arthur M., Gutmann L. // *J. Bacteriol.* 2008. V. 190. № 13. P. 4782–4785.
6. Bielnicki J., Devedjiev Y., Derewenda U., Dauter Z., Joachimiak A., Derewenda Z.S. // *Proteins Struct. Funct. Genet.* 2006. V. 62. № 1. P. 144–151.
7. Biarrotte-Sorin S., Hugonnet J.E., Delfosse V., Mainardi J.L., Gutmann L., Arthur M., Mayer C. // *J. Mol. Biol.* 2006. V. 359. № 3. P. 533–538.
8. Böth D., Steiner E.M., Stadler D., Lindqvist Y., Schnell R., Schneider G. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2013. V. 69. № 3. P. 432–441.
9. Kim H.S., Im H.N., An D.R., Yoon J.Y., Jang J.Y., Mobashery S., Heseck D., Lee M., Yoo J., Cui M., et al. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 41. P. 25103–25117.
10. Gupta R., Lavollay M., Mainardi J.L., Arthur M., Bishai W.R., Lamichhane G. // *Nat. Med.* 2010. V. 16. № 4. P. 466–469.
11. Erdemli S.B., Gupta R., Bishai W.R., Lamichhane G., Amzel L.M., Bianchet M.A. // *Structure.* 2012. V. 20. № 12. P. 2103–2115.
12. Kim H.S., Kim J., Im H.N., Yoon J.Y., An D.R., Yoon H.J., Kim J.Y., Min H.K., Kim S.J., Lee J.Y., et al. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2013. V. 69. № 3. P. 420–431.
13. Correale S., Ruggiero A., Capparelli R., Pedone E., Berisio R. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2013. V. 69. № 9. P. 1697–1706.
14. Dubée V., Triboulet S., Mainardi J.L., Ethève-Quellejeu M., Gutmann L., Marie A., Dubost L., Hugonnet J.E., Arthur M. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. V. 56. № 8. P. 4189–4195.
15. Dhar N., Dubée V., Ballell L., Cuinet G., Hugonnet J.E., Signorino-Gelo F., Barros D., Arthur M., McKinney J.D. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015. V. 59. № 2. P. 1308–1319.
16. Балдин С.М., Мисюра Н.М., Швядас В.К. // *Acta Naturae.* 2017. V. 9. № 1. P. 47–54.
17. Purification of His-tag proteins. // MACHEREY-NAGEL. 2014. V. Rev.06.
18. Itzhaki R.F., Gill D.M. // *Anal. Biochem.* 1964. V. 9. № 4. P. 401–410.
19. Ellman G.L. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1959. V. 82. № 1. P. 70–77.