

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 α -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

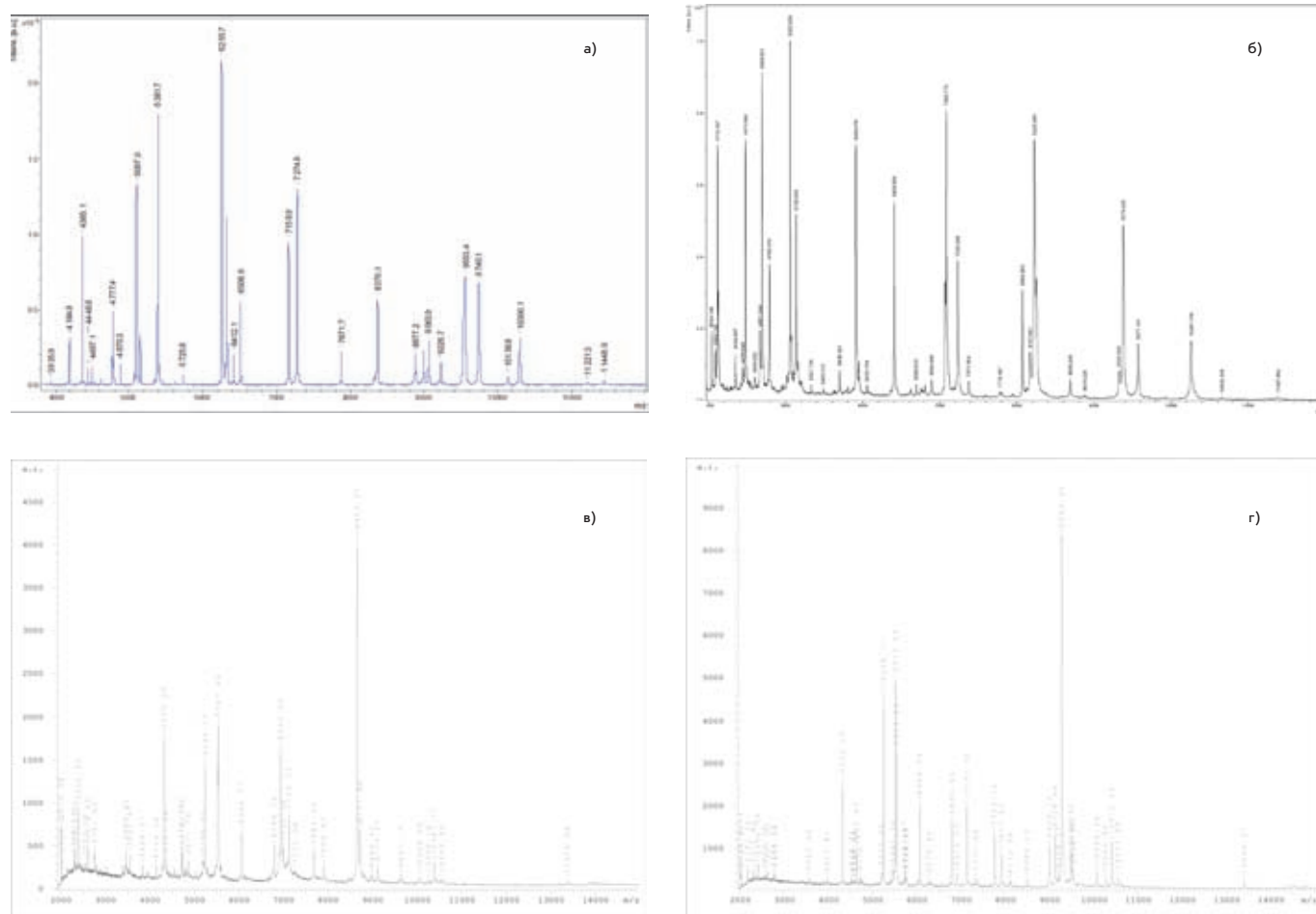


Рис. 1. МАЛДИ масс-спектры экстрактов клеток штаммов *E. coli* DH-5α (а), *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 (б), *H. pylori* J99 (в) и *H. pylori* 26695, снятые при использовании α-СНСА матрицы

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 α -циано-4-гидроксикоричную кислоту (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, α -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 ± 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 ± 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 α , 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 ¹ (Да)	Тип иона ²	Описание
1	4474	4473	M+H ⁺	RL36
2	4511			
3	4689	9377 ³	M+2H ⁺	RS20
4	4784	9570	M+2H ⁺	RL27
5	5010			
6	5052	5051	M+H ⁺	RL34
7	5130	10259 ³	M+2H ⁺	RS19
8	5484			
9	5908	5907	M+H ⁺	RL33
10	5946			
11	6053			
12	6404	6402 ²	M+H ⁺	RL32
13	7080	7078	M+H ⁺	RL29
14	7227	7226 ³	M+H ⁺	RL35
15	8068			
16	8167	8165	M+H ⁺	RL31
17	8225	8224 ³	M+H ⁺	RS21
18	9379	9377 ³	M+H ⁺	RS20
19	9570	9568 ³	M+H ⁺	RL27
20	10260	10259 ³	M+H ⁺	RS19

¹ – масса белка, аннотированная в базах данных SwissProt/TrEMBL.
² – тип ионов указан только для пиков, которым поставлены в соответствие белки.
³ – 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 α .

Типичные МАЛДИ масс-спектры, полученные для лабораторных штаммов *E. coli* DH5 α , *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 α 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

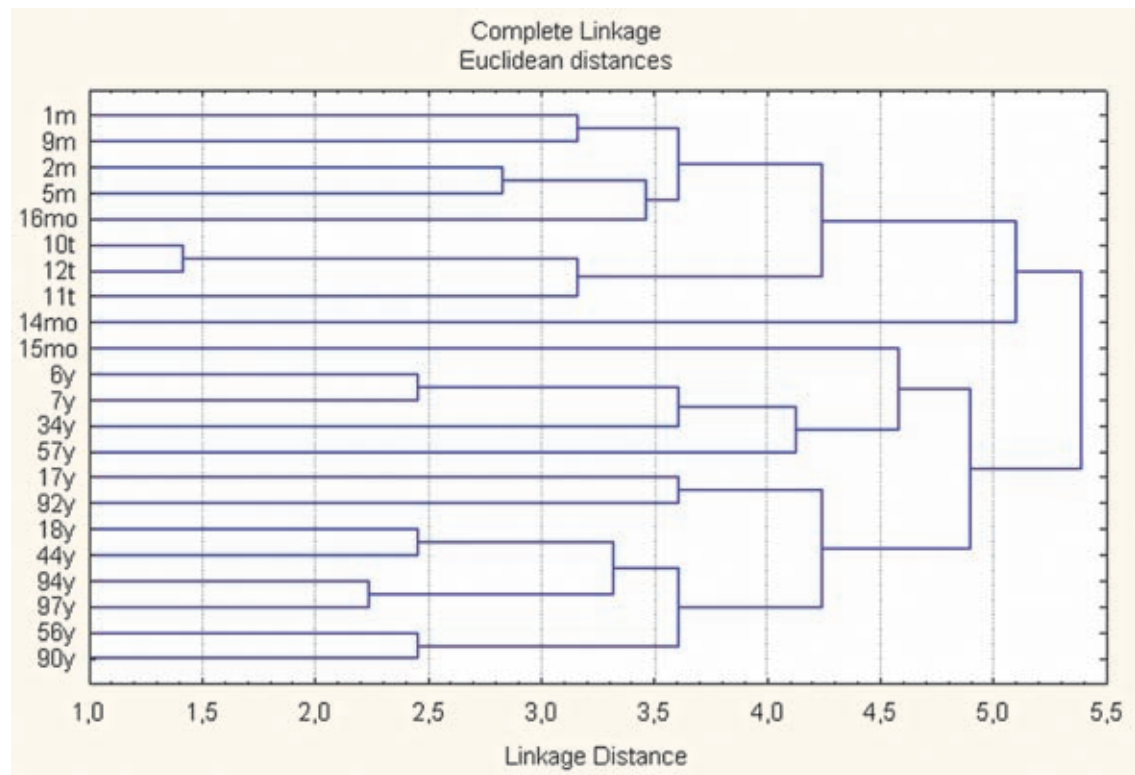


Табл. 2. Перечень максимально воспроизводимых пиков масс-спектров лабораторных штаммов *H. pylori* J99 и *H. pylori* ATCC 26695. Жирным шрифтом выделены пики, предположительно соответствующие рибосомальным белкам

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

¹ – масса белка, аннотированная в базах данных SwissProt/TrEMBL.
² – тип ионов указан только для пиков, которым поставлены в соответствие белки.
³ – указана масса белка с потерей N-концевого метионина.
⁴ – гистидин-богатый металл-связывающий полипептид Hpn (histidine-rich, metal binding polypeptide), про который известно, что он связывает Ni²⁺ и Zn²⁺, 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 Ni²⁺ и Zn²⁺, 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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, Tagvei 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⁺ 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.