

## Секция «Биоинженерия и биоинформатика»

### Клонирование и экспрессия гибридных белков, содержащих антимикробный пептид эскулентин, в клетках бактерий *Escherichia coli* *Совгир Наталья Владимировна*

*Белорусский государственный университет, Биологический факультет, Минск ,  
Беларусь  
E-mail: sovgirnv@inbox.ru*

Одним из наиболее актуальных направлений биотехнологии является поиск путей получения антимикробных пептидов (АМП) для дальнейшего использования их в медицине и ветеринарии в связи с появлением и распространением мультирезистентных штаммов патогенных бактерий. Согласно литературным данным в настоящее время клонирование АМП связано с преодолением ряда проблем, обусловленных в основном особенностями их строения, для решения которых необходимо создание химерных белков [3].

Катионный АМП эскулентин-1b (*Rana esculenta*) обладает широким спектром антибактериальной и антифунгальной активности и является перспективным для применения в качестве лечебного средства в терапии инфекционных заболеваний человека и животных [2]. Эскулентин-С является функциональным аналогом эскулентина-1b, модифицированного для гетерологической экспрессии в бактериях путем добавления метионина на N-конец молекулы. Прямое клонирование гена эскулентина-С в *E. coli* не привело к накоплению данного целевого продукта в клетках бактерий [1], в связи с чем мы решили осуществить экспрессию эскулентина-С в *E. coli* в составе фьюжн-белков, несущих эскулентин-С как на N-, так и на C-концах химерных молекул.

В качестве партнеров эскулентина-С выступали бычий альфа-интерферон (cowIFNalpha), СНАР (цистеин-, гистидин-зависимые амидогидролазы/пептидазы) домены эндолизинов стафилококкового бактериофага К (СНАР-К) и стрептококкового бактериофага В30 (СНАР-В30) и эндолизин стафилококкового бактериофага К (LysK). Экспрессия в клетках *E. coli* всех вышеперечисленных белков, за исключением высоко растворимого СНАР-В30, приводит к образованию телец включения.

Оптимизированные для экспрессии в клетках *E. coli* нуклеотидные последовательности, кодирующие фьюжн-белки, клонировали по сайтам рестрикции Nde I и Eco RI в составе вектора экспрессии pET24b(+) в клетках *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RPL. Уровень экспрессии целевых продуктов оценивали после 4 часов индукции 0,5 мМ ИПТГ электрофоретически в SDS/PAGE.

При сравнении полученных результатов установили, что экспрессируются только те фьюжн-белки, которые содержат эскулентин-С на N-концах молекул: Esc-C/cowIFNalpha, Esc-C/СНАР-К и Esc-C/LysK (8%, 8% и 16% соответственно по результатам денситометрического анализа окрашенных ПААГ). В случае фьюжн-белков Esc-C/СНАР-В30 и СНАР-В30/Esc-C экспрессия не установлена, что может свидетельствовать о необходимости получения АМП эскулентина-С в составе фьюжн-белков, в которых партнером может выступать белок, способный образовывать тельца включения, защищающие АМП от деградации.

## Литература

1. Совгир Н.В., Прокулевич В.А. Клонирование и экспрессия гена антимикробного белка эскулентина-1b (*Rana esculenta*) в клетках бактерий *Escherichia coli* // Труды Белорусского государственного университета, Сер. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. 2011. Т. 6, ч. 1. С. 70–75.
2. Simmaco M., Mignogna G., Barra D., Bossa F. Antimicrobial peptides from skin secretion of *Rana esculenta*. Molecular cloning of cDNA encoding esculentin and brevinins and isolation of new active peptides // *Journal of Biological Chemistry*. 1994. Vol. 269. No 16. P. 11956–11961.
3. Zorko M., Jerala R. Production of Recombinant Antimicrobial Peptides in Bacteria // *Methods Mol. Biol.* 2010. Vol. 618. P. 61–76.

#### **Слова благодарности**

Выражаю благодарность д.б.н., профессору, зав. кафедрой микробиологии и биологического факультета БГУ Прокулевичу В.А., н.с., зав. НИЛ биотехнологии кафедры микробиологии БГУ Потаповичу М.И. и м.н.с. НИЛ биотехнологии кафедры микробиологии БГУ Голенченко С.Г. за помощь, оказанную при выполнении работы.