

Совгир Н. В., Тарашкевич Ю. С., Прокулевич В. А.

ПОЛУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ЭСКУЛЕНТИНА И ЭНДОЛИЗИНА БАКТЕРИОФАГА К В ВИДЕ ФЬЮЖН-БЕЛКА

Белорусский государственный университет, г. Минск

Для кожных секретов прудовой лягушки (*Rana esculenta*) характерно наличие антимикробного пептида (АМП) эскулентина-1b размером 46 аминокислотных остатков. Этот белок проявляет высокую активность в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий [1]. Согласно литературным источникам [2, 3], эскулентин получают либо путем химического синтеза, либо путем рекомбинантной экспрессии в бактериальных клетках в составе фьюжн-белков.

Эскулентин-С от эскулентина-1b отличается тем, что содержит лейцин вместо метионина в 28 позиции и дополнительный метионин в 47 позиции (замена M28L). Для получения эскулентина-С (Esc-С) в качестве фьюжн-партнёра может выступать лизирующий фермент бактериофага К длиной 495 аминокислотных остатков (LysK), который проявляет специфическую литическую активность в отношении антибиотикоустойчивых штаммов золотистого стафилококка *S. aureus* [4]. Данный белок по размеру на порядок превосходит эскулентин и эффективно экспрессируется в клетках *E. coli* [1].

Целями работы являлись оптимизация индукции экспрессии гибридного гена Esc-CLysKHis в клетках бактерий *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-

R IPL и оценка возможности получения целевого белка в растворимой форме при 37 °С.

Материалы и методы

Рекомбинантная плаزمида pET-Esc-CLysKHis, полученная в НИЛ биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета БГУ, содержала гибридный ген Esc-CLysKHis, клонированный по сайтам рестрикции *Nde* I и *Xho* I.

Штамм *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL (*F'* *ompT hsdS* (r_{BMВ}) *dcm*+Tet^r gal λ (DE3) *endA Hte* [*argU proL Cam*^r] [*argU ileY leuW Strep/Spec*^r] из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета БГУ использовали для индуцибельной экспрессии гибридного гена.

Клонирование гибридного гена в клетках *E. coli* и ДСН-ПААГ-электрофорез суммарных клеточных белков проводили согласно [5, 6]. Экспрессию генов индуцировали путем добавления ИПТГ в LB-бульоне в течение 4 ч при 37 °С. Бактериальные клетки разрушали гомогенизатором высокого давления «Panda Plus» (Италия) (1000 бар). Процентное содержание белков оценивали при анализе фотографий окрашенных полиакриламидных гелей при помощи пакета программ TotalLab TL120 1D v2009 (Nonlinear Dynamics Ltd., Великобритания).

Результаты и обсуждение

Гибридный ген Esc-CLysKHis, клонированный по сайтам рестрикции *Nde* I и *Xho* I в составе экспрессионного вектора pET-24b(+), кодирует фьюжн-белок, который состоит из эскулентина-С и эндолизина стафилококкового бактериофага К, который находится на С-конце белка. LysK снабжен гистидиновой меткой для металл-хеллатной хроматографической очистки фьюжн-белка.

Рекомбинантной плазмидой pET-Esc-CLysKHis трансформировали бактерии *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. В результате индукции экспрессии гена Esc-CLysKHis и последующего электрофоретического анализа суммарных клеточных белков *E. coli* зафиксировали белковый продукт, по массе равный 60,5 кДа, что соответствует размеру белка Esc-CLysKHis.

При проведении оптимизации экспрессии гибридного гена установили, что наибольший выход фьюжн-белка (около 14 % от общего количества клеточного белка) наблюдается при оптической плотности культуры 0,8 (λ 600 нм) и концентрации ИПТГ 0,5 ммоль/л.

Для оценки возможности получения белка в растворимой форме клетки штамма-производителя фьюжн-белка после индукции разрушали и при помощи ДСН-ПААГ электрофореза анализировали отцентрифугированный лизат (рис.).

В том случае, если белок Esc-CLysKHis нерастворим и образует тельца включения, он должен локализоваться преимущественно в осадке, а если накапливается в растворимой форме — то в супернатанте клеточного лизата.

Как видно из электрофореграммы, в основном целевой белок Esc-CLysKHis находится в осадке, что свидетельствует об образовании им телец включения при температуре культивирования штамма-продуцента 37 °С.

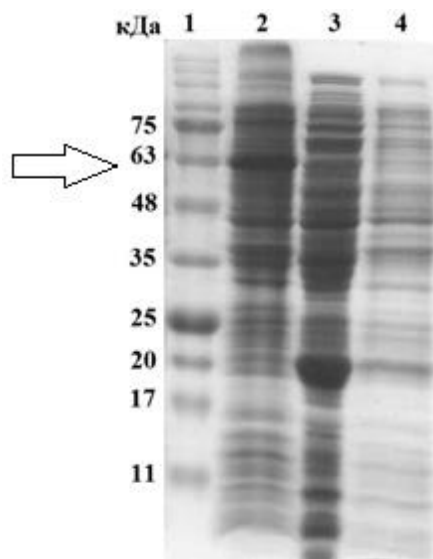


Рис. Электрофореграмма суммарных клеточных белков *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL Дорожки:

1 — маркер молекулярного веса Blue wide Range Protein Ladder («Clever Scientific Ltd.»); 2 — рЕТ-Esc-CLysKHis (осадок клеточного лизата); 3 — рЕТ-Esc-CLysKHis (надосадок клеточного лизата); 4 — рЕТ-Esc-CLysKHis без индукции. Стрелкой обозначен целевой белок массой 60,5 кДа

Выводы

1. В результате оптимизации экспрессии гена Esc-CLysKHis в клетках бактерий *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL установлено, что наибольший выход продукта от общего белка клетки наблюдался при значении оптической плотности бактериальной культуры 0,8 (λ 600 нм) и концентрации ИПТГ равной 0,5 ммоль/л.

2. Выявлено, что фьюж-белок Esc-CLysKHis при температуре культивирования штамма-продуцента, равной 37 °С, синтезируется в нерастворимой форме.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Novel antimicrobial peptides from skin secretion of the European frog *Rana esculenta** / M. Simmaco [et al.] // FEBS Letters. 1993. Vol. 324, N 3. P. 159–161.

2. *Esculentin-1b (1–18) — a membrane-active antimicrobial peptide that synergizes with antibiotics and modifies the expression level of a limited number of proteins in *Escherichia coli** / L. Marcellini [et al.] // FEBS Journal. 2009. Vol. 276, N 19. P. 5329–5718.

3. *Expression and activity of cyclic and linear analogues of esculentin-1, an antimicrobial peptide from amphibian skin* / D. Ponti [et al.] // European Journal of Biochemistry. 1999. Vol. 263, N 3. P. 921–927.

4. *Phage Lysin LysK can be truncated to its chap domain and retain lytic activity against live antibiotic-resistant *Staphylococci** / M. Horgan [et al.] // Appl Environ Microbiol. 2009. Vol. 75, N 3. P. 872–874.

5. *Current protocols in molecular biology* / F. M. Ausubel [et al.]. New York : John Wiley & Sons LTD, 1993. Vol. 1.

6. *Laemmli, U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature (Lond.)*. 1970. Vol. 227. P. 680–685.

Sovgir N. V., Tarashkevich J. S., Prokulevich V. A.

Production of antimicrobial peptide esculentin and phage K endolysin as a fusion protein

Poly-His-tagged phage K endolysin (LysKHis) was chosen as the C-terminal fusion partner for esculentin-C (Esc-C) (C-terminus of Esc-C fused to the N-terminus of LysKHis). *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL was transformed with pET-Esc-CLysKHis recombinant vector. We carried out optimization of gene expression and showed that expression of the hybrid gene at 37 °C leads to intracellular accumulation of Esc-CLysKHis protein (60.5 kDa) in inclusion bodies form.