

Янушкевич Д. М., Совгир Н. В., Прокулевич В. А.

ПОЛУЧЕНИЕ N-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ЭСКУЛЕНТИНА В СОСТАВЕ ФЬЮЖН-БЕЛКА

Белорусский государственный университет, г. Минск

Антимикробные пептиды (АМП) представляют собой короткие белковые молекулы, которые вырабатываются клетками растений, животных и человека для борьбы с патогенами и могут выступать альтернативой антибиотикам.

Эскулентин-1а относится к семейству пептидов эскулентина-1 кожных секретов лягушек вида *Rana esculenta* [1]. Активность этого пептида против многих видов патогенных бактерий и грибов обусловлена N-концевой областью, обладающей зарядом полноразмерного пептида (+5 при нейтральном значении pH) [2]. Для получения в клетках бактерий *Escherichia coli* небольших пептидов целесообразно использовать технологию слияния генов для получения фьюжн-белков, в которых фьюжн-партнёром может выступать, например, малый убиквитин-подобный модификатор (small ubiquitin-related modifier, SUMO) *Saccharomyces cerevisiae* [3], стабилизирующий и повышающий растворимость фьюжн-белков.

Целью данной работы являлось получение N-концевого фрагмента эскулентина-1а в составе фьюжн-белка совместно с SUMO в клетках бактерий *E. coli*.

Материалы и методы

Плазмиду pET-Esc-a(1-21), содержащую ген N-концевого фрагмента эскулентина-1а, клонированный по сайтам рестрикции *Nde* I и *Eco* RI, использовали для получения гибридного гена HST-Esc-a(1-21). Плазида pET-6xHis-SUMO-TEV содержала последовательность 6xHis-SUMO-TEV, клонированную по сайту рестрикции *Nde* I.

Штамм *E. coli* XL-1 Blue (*F'* *proABlacIqlacZAM15Tn10(Tc^r)/recA1 endA1gyrA96(Nal^r) thi-1 hsdR17supE44 relA1 lac*) из коллекции кафедры молекулярной биологии и штамм *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL (*F'* *ompT hsdS (г_{ВМВ}) 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 клонирования и индуцибельной экспрессии гибридного гена соответственно.

Клонирование гибридного гена в клетках *E. coli* и ДСН-ПААГ-электрофорез клеточных белков проводили согласно стандартным методикам [4–6]. Бактериальные клетки разрушали гомогенизатором высокого давления «Panda Plus» (Италия). Цифровые фотографии окрашенных полиакриламидных гелей анализировали при помощи пакета программ TotalLab TL120 1D v2009 (Nonlinear Dynamics Ltd., Великобритания).

Результаты и обсуждение

Сшивание гена N-концевого фрагмента эскулентина-1а — Esc-a(1-21) с нуклеотидной последовательностью 6xHis-SUMO-TEV (HST) в составе вектора для экспрессии позволяет получить фьюжн-белок HST-Esc(1-21), который на N-конце содержит белок SUMO, снабженный полигистидиновой аффинной меткой для никель-хелатной хроматографии (6xHis), а на C-конце — Esc-a(1-21). Между белком-партнёром и АМП находится сайт узнавания для TEV протеазы в целях удаления фьюжн-партнера от целевого белка.

Для получения гибридного гена нуклеотидную последовательность HST по сайту рестрикции *Nde* I вырезали из плазмиды pET-6xHis-SUMO-TEV и клонировали в составе плазмиды pET-Esc-a(1-21). Полученной в результате лигирования рекомбинантной плазмидой pET-HST-Esc-a(1-21) трансформировали бактерии *E. coli* XL-1 Blue. Далее осуществляли проверку трансформантов на наличие вставки при помощи ПЦР, проверяли правильность ориентации вставки HST рестрикционным анализом и секвенированием.

С целью выявления фьюжн-белка рекомбинантной плазмидой pET-HST-Esc-a(1-21) трансформировали клетки штамма *E. coli* BL21-Codon Plus(DE3)-RIPL и индуцировали экспрессию гибридного гена ИПТГ в концентрации 0,5 ммоль/л в течение 4 часов в питательной среде LB. В результате анализа экспрессии фьюжн-белка при помощи ДСН-ПААГ электрофореза установлена эффективная экспрессия белка HST-Esc-a(1-21) (16,7 кДа) в количестве 25 % от общего количества клеточных белков (рис.).

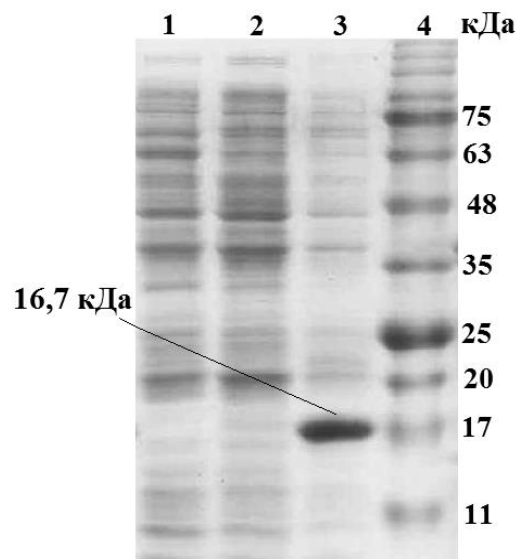


Рис. Электрофореграмма суммарных клеточных белков бактерий *E. coli* BL21-Codon Plus(DE3)-RIPL. Дорожки:
1 — pET-24b(+) (0,5 ммоль/л ИПТГ) (контроль); 2 — pET-HST-Esc-a(1-21) без индукции (контроль); 3 — pET-HST-Esc-a(1-21) (0,5 ммоль/л ИПТГ); 4 — маркер молекулярного веса Blue wide Range Protein Ladder («Clever Scientific Ltd»)

Далее определяли локализацию целевого белка в клетках бактерий при температуре культивирования равной 37 °С. Для чего после индукции экспрессии в течение 4 часов клетки разрушали, а клеточный лизат подвергали ДСН-ПААГ электрофорезу, после проведения которого установили, что экспрессируемый белок HST-Esc-a(1-21) накапливается преимущественно в растворимой клеточной фракции при оптимальной для бактерий температуре культивирования.

Выводы:

1. В клетках штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, содержащего рекомбинантную плазмиду pET-HST-Esc-a(1-21), в результате индукции экспрессии выявлено накопление продукта массой 16,7 кДа, соответствующего химерному белку HST-Esc-a(1-21).

2. Установлено, что при оптимальной для культивирования бактерий *E. coli* температуре, равной 37 °С, белок HST-Esc-a(1-21) экспрессируется преимущественно в растворимой форме.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Antimicrobial peptides from skin secretion of Rana esculenta*. Molecular cloning of cDNA encoding esculentin and brevinins and isolation of new active peptides / M. Simmaco [et al.] // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269, N 6. P. 11956–11961.

2. *Esculentin 1-21* : a linear antimicrobial peptide from frog skin with inhibitory effect on bovine mastitis-causing bacteria / A. E. Islas-Rodriguez [et al.] // J. Pept. Sci. 2009. N 15. P. 607–614.

3. *SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins* / T. R. Butt [et al.] // Protein Expr. Purif. 2005. Vol. 43, N 1. P. 1–9.

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

5. *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.

6. *McPherson, M. J.* PCR / M. J. McPherson, S. G. Møller. Oxford : BIOS Scientific Publishers, 2000.

Yanushkevich D. M., Sovgir N. V., Prokulevich V. A.

Production of antimicrobial peptide esculentin N-terminal fragment as a part of fusion proteins

Poly-His-tagged small ubiquitin-related modifier of *Saccharomyces cerevisiae* with the recognition site for TEV protease (HST) was chosen as the N-terminal fusion partner for esculentins N-terminal fragments (Esc-a(1-21)). The HST-Esc-a(1-21) hybrid gene was cloned in expression vector pET-24b(+) and transformed into *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL. We showed that expression of the cloned gene at 37 °C leads to intracellular accumulation in bacterial cells of protein by mass corresponding HST-Esc(1-21) (16.7 kDa) predominantly in soluble form.