

Экспрессия гена кератиназы *Bacillus licheniformis* в клетках штамма *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Научный руководитель – Зинченко Анатолий Иванович

Чиндарева Мария Александровна

Аспирант

Института подготовки научных кадров Национальной академии наук Беларуси,
Кафедра естественно-научных дисциплин, Минск, Беларусь
E-mail: maryja.che@gmail.com

Кератины представляют собой водонерастворимые фибриллярные белки, которые формируют структурный компонент эпидермиса и входят в состав перьев, шерсти, ногтей, волос и других образований человека и животных. Ввиду наличия большого числа дисульфидных связей, данные белки трудно разлагаются обычными протеолитическими ферментами, такими как пепсин, трипсин и папаин, что приводит к их накоплению в окружающей среде. Наиболее экологически безопасным и энергоэффективным методом утилизации кератиносодержащих отходов является ферментативный гидролиз с помощью кератиназ [1]. Процесс гидролиза в данном случае сопровождается высвобождением ценных аминокислот и пептидов, которые в дальнейшем могут быть использованы в качестве кормовых добавок или биоудобрений. Кроме того, кератиназы находят свое применение в кожевенной и текстильной промышленности, а также в медицине и косметологии [2].

Целью работы являлось получение рекомбинантного штамма *Escherichia coli*, продуцирующего кератиназу *Bacillus licheniformis*.

На первом этапе были разработаны праймеры для амплификации и клонирования гена *kerA*, кодирующего кератиназу *B. licheniformis*. В качестве экспрессионного вектора использовали плазмиду pET42a(+), содержащую T7-промотор и ген *kanR*, обуславливающий устойчивость к антибиотику канамицину. Объединение гена *kerA* и линейаризованного вектора pET42a(+) осуществляли методом продолжительной перекрывающейся ПЦР [3]. Трансформацию клеток штамма *E. coli* BL21 (DE3) полученной плазмидой осуществляли методом электропорации. Для подтверждения наличия генетической конструкции, несущей ген *kerA* в правильной ориентации, проводили скрининг полученных трансформантов методом ПЦР с использованием праймеров к T7-промотору и целевому гену.

На втором этапе оценивали способность рекомбинантного штамма *E. coli* KerA42 продуцировать кератиназу. Методом электрофореза в полиакриламидном геле был обнаружен целевой белок размером ~48 кДа. Для концентрирования и очистки рекомбинантной кератиназы использовали хроматографическую колонку с Ni-NTA-агарозой. Протеазная активность была определена при стандартных условиях с использованием окрашенного субстрата азоказеина и составила 2,85 ед/мл ферментного препарата. Температурный оптимум целевого белка находился в диапазоне 50-60 °С.

Источники и литература

- 1) Kothari D. Keratinases // Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Elsevier, 2017. Ch. 19. P. 447-469.
- 2) Srivastava B. et al. Microbial keratinases: An overview of biochemical characterization and its eco-friendly approach for industrial applications // Journal of Cleaner Production. 2020. № 252. P. 1-26.
- 3) Quan J. Circular Polymerase Extension Cloning of Complex Gene Libraries and Pathways // PLoS ONE. 2009. № 7. P. 6441-6442.