

Изучение влияния N-концевой последовательности на синтез и локализацию рекомбинантного химозина лося

Научный руководитель – Балабова Дина Владимировна

Белаи Екатерина Алексеевна

Студент (бакалавр)

Алтайский государственный университет, Биологический факультет, Барнаул, Россия

E-mail: alekseevna_ekaterinka@list.ru

Химозин - аспаратная эндопептидаза (ЕС 3.4.23.4), гидролизует ключевую пептидную связь -Phe₁₀₅-Met₁₀₆ в молекуле каппа-казеина, что приводит к дестабилизации казеиновых мицелл и образованию сычужного сгустка, являющегося основой для производства огромного ассортимента сыров (Uniacke-Lowe, Fox, 2017).

Постоянный рост объемов вырабатываемых сыров, истощение сырьевой базы натуральных молокозвертывающих ферментов животного происхождения, эпидемия прионовых заболеваний сельскохозяйственных животных в конце прошлого века, привели к возникновению мирового дефицита сычужного фермента, основным действующим агентом которого является химозин. Дефицит сычужного фермента активизировал поиски его заменителей среди природных протеиназ животного, растительного и микробного происхождения (Harboe et al., 2010). Большой интерес представляют химозины оленевых некоторые, из которых уже показали комплекс свойств полезных для сыроделия (Ельчанинов, 2006). Целью работы было изучение влияния N-концевой последовательности на синтез и локализацию рекомбинантного химозина лося в прокариотической системе.

Для получения рекомбинантного прохимозина нами была использована система *Escherichia coli*, как наиболее простая. Но попытки получить ферментативно активный прохимозин в данной системе сталкиваются с его низкой активностью. Рекомбинантный прохимозин накапливается в виде телец включения в клетках и для восстановления его активности требуется сложная процедура рефолдинга. Альтернативным путем повышения растворимости белка и увеличения его активности является разработка химерных белков. Были получены конструкции обеспечивающие синтез прохимозина лося с различными N-концевыми тагами, представляющими собой белки дисульфидного обмена *E. coli*, DsbA, DsbC и DsbG. Полученные рекомбинантные плазмиды, pET21-DA-Mos, pET21-DG-Mos и pET21-DC-Mos, содержат последовательности, кодирующие различные N-концевые довески в единой с прохимозином лося рамке считывания.

Включение N-концевых довесок должно обеспечить транспорт белка в периплазматическое пространство клеток *E. coli*, а также препятствовать его агрегации, сохраняя в растворимом состоянии. Для получения целевого белка была проведена химическая трансформация штамма BL21 *E. coli* полученными конструкциями. Синтез белка индуцировали добавлением IPTG. Продукцию рекомбинантного белка в клетках *E. coli* анализировали при помощи электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия. В результате был показан синтез целевых белков и их локализация во фракции периплазматических белков.

Ельчанинов В.В. Исследование молокозвертывающего фермента из сычугов северных оленей: дис. ... канд. техн. наук. - Кемерово, 2006. - 172 с.

Harboe M., Broe M.L., Qvist K.B. In: Technology of Cheesemaking. Law BA, Tamime A Y, Eds., John Wiley & Sons., 2010, Ch. 3. The production, action and application of rennet and coagulants., P. 98-129.

Uniacke-Lowe T., Fox P.F. Cheese: chemistry, physics and microbiology. Oxford, UK: Elsevier, Academic Press, 2017. P. 69-113.