

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI* ГЕНА ПЕКТИНЛИАЗЫ БАКТЕРИИ *ERWINIA CAROTOVORA* SUBSP. *ATROSEPTICA* 3-2

М.А. Жилинская, Е.А. Николайчик, А.Н. Евтушенков

Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь, nikolaichik@bsu.by

Erwinia carotovora – фитопатоген, который вызывает возникновение мягких гнилей у широкого круга дикорастущих и возделываемых растений. Генетические и биохимические исследования показали, что патогенные свойства обусловлены синтезом и секрецией ряда ферментов, которые участвуют в деградации компонентов клеточных стенок растений. К основным внеклеточным ферментам относятся пектиназы, включающие пектинлиазы, пектатлиазы и полигалактуронатлиазы, а также целлюлазы и протеазы. Среди пектолитических ферментов пектинлиазы представляют особый интерес, поскольку эти ферменты, в отличие от пектатлиаз и полигалактуроназ, имеют наиболее высокую активность на природных высокометилованных пектинах и, следовательно, представляют наибольший интерес для биотехнологии.

В отличие от других пектолитических ферментов, пектинлиазы продуцируются немногими бактериями, причем гены пектинлиаз обычно находятся под специфическим контролем, не позволяющим добиться их сильной экспрессии. Так, у *Erwinia carotovora* ген пектинлиазы входит в SOS-регулон и его экспрессия совпадает с SOS-индуцированным лизисом клетки, из-за чего получить сколь-нибудь существенную продукцию фермента этими бактериями достаточно сложно.

В связи с вышесказанным первоочередной целью нашей работы являлось молекулярное клонирование гена пектинлиазы из обладающего соответствующей активностью штамма бактерий и оптимизация его экспрессии. В качестве вектора экспрессии была выбрана плаزمида рFLAG-СТС, имеющая в своем составе сильный регулируемый *tac*-промотор, а также удобный полилинкер, позволяющий не только поместить клонируемый ген под контроль промотора, но и присоединить к его 3'-концу восемь кодонов FLAG-эпитопа, что в дальнейшем может существенно облегчить детекцию продукта экспрессируемого гена.

Ген пектинлиазы был амплифицирован при помощи ПЦР из штамма *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 3-2, у которого пектинлиазная активность четко детектировалась после индукции митомицином С. Праймеры для амплификации (5' GRAWACATATGGCTTAKCCAACAACA 3' и 5' CTCAAGAATTTCYGAYGGGAATTTTSAG 3') были подобраны на основе имеющихся в базах данных трех гомологичных последовательностей из других штаммов *Erwinia carotovora*. Продукт ПРЦ размером около 0.9 т.н.п. был клонирован на плазмиде рFLAG-СТС с использованием сайтов для рестриктаз *NdeI* и *EcoRI*, включенных в последовательность праймеров. Полученная плазмиды была введена в клетки *Escherichia coli* XL1-Blue, где была проверена экспрессия рекомбинантного белка после индукции при помощи ИПТГ. При ДСН-ПААГ электрофорезе после индукции четко детектировалась дополнительная полоска белка молекулярной массой около 37 кДа, что соответствует ожидаемому размеру рекомбинантной пектинлиазы (с учетом добавленного С-концевого фрагмента). Клеточные экстракты индуцированной культуры XL1-Blue с рекомбинантной плазмидой обладали высокой пектинлиазной активностью, что свидетельствует о том, что добавление FLAG-пептида к С-концу пектинлиазы не инактивировало фермент. В дальнейшем предполагается исследовать

путь секреции нативной и рекомбинантной пектинлиазы клетками *Erwinia* и *Escherichia coli*.