

molecular weight of esculentin fusion partner. Also data obtained indicate that esculentin as a part of fusion protein can be synthesized in the soluble form at 19 °C and 37 °C.

ГИБРИДНЫЙ ГЕН, СОДЕРЖАЩИЙ НУКЛЕОТИДНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ЭСКУЛЕНТИНА ЛЯГУШКИ

Н.В. Совгир, А.В. Бусленко, В.А. Прокулевич

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
sovgirnv@gmail.com

Антимикробный пептид эскулентин-b(1–20) (Esc-b(1–20)) длиной 20 а.о. является N-концевым производным пептида эскулентина-1b лягушки *Rana esculenta* L., 1758, который не экспрессируется в клетках *Escherichiacoli* [1] и даже в составе фьюжн-белков остается токсичным для клеток штамма-продуцента [2]. N-концевой фрагмент эскулентина-1b сохраняет свойства полноразмерного пептида, обеспечивающие его антимикробную активность [3], однако такие короткие и нестабильные молекулы рекомбинантных пептидов оптимально получать в составе фьюжн-белков. В данной работе фьюжн-партнёром пептида Esc-b(1–20) выступал малый убиквитин-подобный модификатор (smallubiquitin-relatedmodifier, SUMO) дрожжей *Saccharomycescerevisiae*, который будучи анионным, может компенсировать суммарный положительный заряд, определяющий антимикробную активность эскулентина-b(1–20) [4].

Целью работы являлось конструирование с последующим клонированием в клетках *E. coli* гена, кодирующего рекомбинантный фьюжн-белок SUMO-Esc-b(1–20), который на N-конце содержит растворимый анионный белок SUMO с гистидиновой меткой, а на C-конце – катионный пептид эскулентин-b(1–20) (Esc-b(1–20)). Между фьюжн-партнерами введён сайт узнавания TEV протеазы (tobaccoetchvirusprotease) [5], с помощью которой, при необходимости, можно отделить целевой белок Esc-b(1–20) от фьюжн-партнёра.

Для создания гибридной конструкции амплифицированную последовательность гена *SUMO* и ДНК плазмиды pET-*Esc-b(1–20)*, подвергали рестрикции ферментом *Nde* I. Далее плазмиду дефосфорилировали и лигировали с геном *SUMO*. Полученными

рекомбинантными плазмидами рЕТ-*SUMO-Esc-b(1–20)* трансформировали бактерии штамма *E. coli* XL-1 Blue. Проверку клонов на наличие вставки осуществляли при помощи ПЦР-анализа с использованием фланкирующих праймеров для полилинкерной области плазмиды рЕТ-24b(+). В результате проведённого электрофореза установили наличие гена *SUMO-Esc-b(1–20)* у семи трансформантов из десяти исследованных.

Для проверки правильности ориентации вставки *SUMO* ампликоны, содержащие гибридную последовательность *SUMO-Esc-b(1–20)*, обрабатывали рестриктазой *Nhe* I, т.к. сайт для этой рестриктазы является уникальным для всего гибридного гена и расположен между генами *SUMO* и *Esc-b(1–20)*. Электрофоретически установили, что четырёх из семи клонов имеют вставку с правильной ориентацией гена *SUMO*.

Таким образом, ПЦР-анализом трансформантов и рестрикционным анализом ампликонов *SUMO-Esc-b(1–20)* подтверждено клонирование в составе вектора серии рЕТ целевого гибридного гена в клетках штамма *E. coli* XL-1 Blue.

1. Совгир, Н.В. Клонирование и экспрессия гена антимикробного белка эскулентина-1b (*Ranaesculenta*) в клетках бактерий *Escherichiacoli* / Н.В. Совгир, В.А. Прокулевич // Тр. БГУ. Сер.: Физиол., биохим. и мол. основы функционирования биосистем. – 2011. – Т. 6 в 2 ч. Ч. 1. – С. 70–75.

2. Совгир, Н.В. Особенности экспрессии гибридных генов, созданных на основе последовательностей ДНК гена антимикробного пептида эскулентина лягушки и гена антивирусного белка бычьего альфа-интерферона / Н.В. Совгир, М.И. Потапович, В.А. Прокулевич // Тр. БГУ. Сер.: Физиол., биохим. и мол. основы функционирования биосистем. – 2013. – Т. 9 в 2 ч. Ч. 2 – С. 207–215.

3. 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.] // The FEBS Journal. – 2009. – Vol. 276, No 19. – P. 5647–5664.

4. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins / T.R. Butt [et al.] // Protein Expr. Purif. – 2005. – Vol. 43, No 1. – P. 1–9.

5. Waugh, D. TEV Protease FAQ / D. Waugh // National cancer institute. Macromolecular crystallography laboratory. – 2000. – P. 1–7.

HYBRID GENE CONTAINING FROG ANTIMICROBIAL PEPTIDE
ESCULENTIN NUCLEOTID SEQUENCE

N.V. Sovgir, H.U. Buslenka, V.A. Prokulevich

Belarusian State University, Minsk, Belarus

sovgirnv@gmail.com

Hybrid genetic construction composed of *Saccharomyces cerevisiae* small ubiquitin-related modifier (SUMO) gene and N-terminal fragment of frog antimicrobial peptide esculentin-1b (*Rana esculenta* L., 1758) gene was designed. This genetic construction was cloned into the expression vector pET-24b(+). Recombinant plasmid was transformed into *E. coli* strain XL-1 Blue. The accuracy of the created hybrid gene sequence was confirmed by PCR analysis of transformants and restriction analysis of amplicons.

**ХАРАКТЕРИСТИКА И ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ *JANTHINOB
ASTERIUM LIVIDUM*,
СИНТЕЗИРУЮЩИХ ФИОЛЕТОВЫЙ ПИГМЕНТ**

Н.В. Совгир¹, Е.Ю. Гетко¹, А.А. Барейко², А.В. Сидоренко^{1,2}

¹*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

²*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

sovgirnv@gmail.com

Микроорганизмы – один из наиболее доступных и рентабельных источников получения биологически активных веществ, необходимых для промышленности и научных исследований. Особый интерес в данном отношении представляют почвенные бактерии, среди которых обнаруживаются продуценты широкого спектра хозяйственно ценных соединений – антибиотиков, пигментов, ферментов, способные расти на бедных питательных средах, в широком диапазоне температур и значений pH.

В 2015 году из почвы возле биологического факультета БГУ выделены 2 штамма бактерий, синтезирующих внутриклеточный пигмент фиолетового цвета, предположительно, виолацеин. Оба штамма являются психротрофами, способны расти в диапазоне температур от 4 °С до 28 °С, температурный оптимум – 18 °С. Через 24 ч культивирования на мясо-пептонном агаре при 18 °С формируют округлые выпуклые блестящие колонии с ровным краем, через 36 ч отмечается накопление темно-