

КЛОНИРОВАНИЕ N-КОНЦЕВЫХ ФРАГМЕНТОВ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ЭСКУЛЕНТИНА

А. А. Нагорная, Н. В. Совгир

ВВЕДЕНИЕ

Катионные пептиды эскулентин-1b и эскулентин-1a являются представителями семейства антимикробных пептидов (АМП) эскулентина-1 прудовой лягушки (*Rana esculenta*). Оба пептида обладают широким спектром антибактериальной активности, состоят из 46 аминокислотных остатков и содержат семичленное С-терминальное кольцо («Rana box»), которое стабилизируется дисульфидным мостиком [6]. Согласно литературным данным полученные при помощи химического синтеза N-концевые фрагменты антимикробных пептидов эскулентина-1b и эскулентина-1a проявляют такую же антимикробную активность, как и полноразмерные белки [2, 4, 5]. Это можно объяснить тем, что именно на N-концах молекул эскулентина-1b и эскулентина-1a сконцентрированы положительно заряженные аминокислоты, обеспечивающие взаимодействие молекул АМП с отрицательно заряженными компонентами клеточных стенок микроорганизмов.

Эскулентин-1a(1-21) (далее Esc-a(1-21)) состоит из первых 20 аминокислотных остатков эскулентина-1a и дополнительного остатка глицина. Эскулентин-1b(1-20) (далее Esc-b(1-20)) представляет собой первые 20 аминокислотных остатка эскулентина-1b. Кроме дополнительного остатка глицина, Esc-a(1-21) отличается от Esc-b(1-20) аминокислотной заменой лейцина на изолейцин (L11I). Оба N-концевых фрагмента обладают суммарным зарядом молекул равным +5 при нейтральном значении pH, как и полноразмерные АМП.

Целью данной работы являлось клонирование генов Esc-a(1-21) и Esc-b(1-20) в составе вектора для экспрессии pET-24(+)-b клетках бактерий *E. coli*.

Клонированные гены в дальнейшем планируется использовать для получения гибридных генетических последовательностей, кодирующих фьюжн-белки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Плазмиду pET-24b(+)-b (Novagen) использовали в качестве вектора для клонирования генов.

Штамм *E. coli* XL1-Blue (*F' proAB lacIqlacZΔM15 Tn10(Tcr)/recA1 endA1 gyrA96(Nal^r) thi-1 hsdR17supE44 relA1 lac*) из коллекции кафедры

молекулярной биологии биологического факультета БГУ использовали для клонирования рекомбинантных плазмид.

Аmplификацию фрагментов ДНК проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в смеси стандартного состава [3] с использованием реактивов производства фирмы «Thermo Scientific» и праймеров производства фирм «Праймтех» и «Invitrogen» на амплификаторе Veriti 96 Well Thermal cycler производства фирмы «Applied Biosystems».

Выделение плазмидной ДНК и выделение ДНК из агарозного геля на отдельных этапах работы проводили наборами производства фирмы «QIAGEN» по инструкции, рекомендованной производителем.

Рекомбинантные плазмиды в бактериальные клетки вводили методом кальциевой трансформации. Электрофоретический анализ нуклеиновых кислот проводили согласно стандартным методикам [1].

Рестрикцию плазмидной ДНК и ампликонов, а также лигирование осуществляли с использованием ферментов и буферных систем производства фирмы «Thermo Scientific».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В связи с небольшими размерами клонируемых генов на основе оптимизированных по составу триплетов для экспрессии в *E. coli* последовательностей генов эскулентина-1b и эскулентина-1a были разработаны две пары праймеров (Esc1-20-F и Esc1-20-Re, Esc1-21-F и Esc1-21-Re), имеющих области перекрывания размером около 20 нуклеотидов.

На следующем этапе работы проводили оптимизацию ПЦР для амплификации генов Esc-b(1-20) и Esc-a(1-21) с градиентом температур отжига праймеров от 52 °С до 62 °С (шаг 2 °С). Выход целевого продукта при разных температурах отжига праймеров практически не отличался (данные не представлены), поэтому последующие ПЦР для амплификации генов проводили при температуре отжига праймеров близкой к расчётной – 58°С.

Полученные в результате амплификации гены Esc-b(1-20) и Esc-a(1-21) обрабатывали рестриктазами *Nde* I, *Eco* RI и клонировали в составе экспрессионного вектора pET-24b(+). Далее рекомбинантными плазмидами трансформировали бактерии *E. coli* XL1-Blue.

ПЦР-анализ полученных трансформантов на наличие вставок проводили с использованием праймеров, фланкирующих полилинкерную область плазмиды pET-24b(+): T7Promoter Pr (5'-taatacgactcactataggg-3') и T7Terminator Pr (5'-tatgctagttattgctcag-3'). Для получения ДНК в качестве матрицы для ПЦР клетки бактерий ресуспендировали в 20 мкл деионизированной воды и кипятили на протяжении 5 мин. В качестве отрицательного контроля использовали пробу без ДНК-матрицы. Размер ожидаемого продукта в случае плазмиды pET-Esc-b(1-20) составлял 279 п.н.,

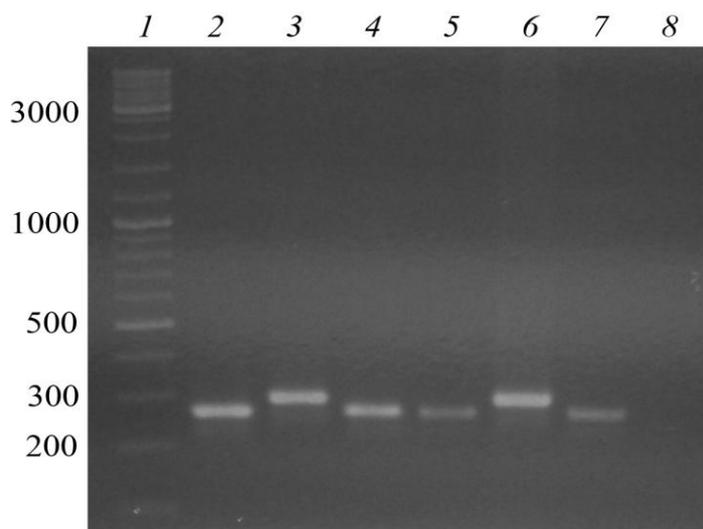


Рис. 1. Результаты проверки трансформантов на наличие гена Esc-b(1-20) в составе рекомбинантных плазмид:

1 – маркер молекулярного веса SM0333 («Thermo Scientific»), 2, 4, 5, 7 – ПЦР-продукты плазмид, не содержащих вставку, 3, 6 – ПЦР-продукты плазмид, содержащих вставку Esc-b(1-20), 8 – отрицательный контроль (проба без ДНК-матрицы)

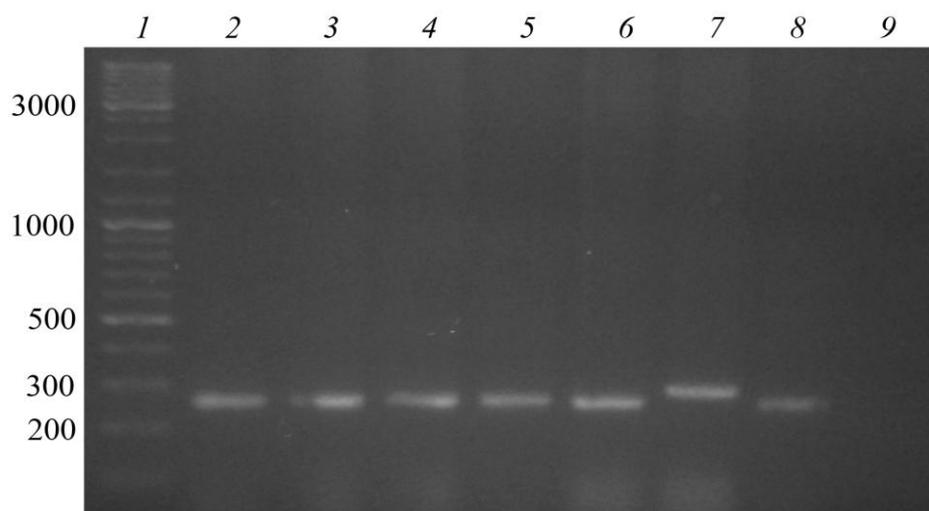


Рис. 2. Результаты проверки трансформантов на наличие гена Esc-a(1-21) в составе рекомбинантных плазмид:

1 – маркер молекулярного веса SM0333 («Thermo Scientific»), 2-6, 8 – ПЦР-продукты плазмид, не содержащих вставку, 7 – ПЦР-продукт плазмиды, содержащей вставку Esc-a(1-21)

в случае плазмиды рЕТ-Esc-a(1-21) – 288 п.н. Об отрицательном результате свидетельствовал продукт размером 258 п.н. Результаты экспериментов представлены на электрофореграммах (рис. 1, 2).

Из клонов, давших положительные результаты, выделяли рекомбинантные плазмиды, содержащие гены Esc-b(1-20) и Esc-a(1-21), и подвергали их рестрикционному анализу (данные не представлены). При этом результаты

ПЦР-анализа и рестрикционного анализа полностью совпали, подтверждая наличие соответствующих вставок в выделенных плазидах.

Таким образом, в результате проведенной работы амплифицированные при помощи разработанных праймеров гены Esc-b(1-20) и Esc-a(1-21) клонированы по сайтам рестрикции *Nde* I и *Eco* RI в составе вектора для экспрессии pET24(+)*b* в клетках *E. coli* XL1-Blue.

Литература

1. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. М.: Мир. 1984. 480 с.
2. Islas-Rodriguez A. E. 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. № 15. P. 607–614.
3. McPherson M. J. PCR / M. J. McPherson, S. G. Møller. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2000. 276 p.
4. Mangoni M. L. Comparative analysis of the bactericidal activities of amphibian peptide analogues against multidrug-resistant nosocomial bacterial strains / M. L. Mangoni [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. 2008. № 52. P.85–91.
5. Marcellini L. 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.] // FEBS Journal. 2009. Vol. 276. № 19. P. 5647–5664.
6. Simmaco M. 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, № 16. P. 11956–11961.

ПОИСК И ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ ПЕРСПЕКТИВНЫХ В ПРОБИОТИЧЕСКОМ ОТНОШЕНИИ

И. В. Петкевич, Н. Е. Сацункевич

В последнее время широко используются биопрепараты на основе живых бактериальных культур для стимуляции роста и развития растений и животных. Они рассматриваются как альтернатива химическим средствам защиты и синтетическим лекарственным препаратам. Например, систематическое использование антибиотиков приводит к серьезным нарушениям в организме животных, возникающих за счет угнетения полезной микрофлоры кишечника и иммунной системы. Использование кормов и кормовых добавок, обработанных бактериями, обладающими антибактериальной и антифунгальной активностями и продуцирующими во внешнюю среду ферменты, способствующие лучшему перевариванию пищи, могут компенсировать отсутствие контактов животного с внешней средой в условиях промышленного производства [1].

Целью настоящей работы являлся поиск и характеристика бактерий с широким спектром антимикробной и ферментативной активности.