

Таблица

Доля клеток с симптомами ЗКГ при обработке корней арабидопсиса полиаминами (в контроле и на фоне антиоксидантов)

		Клетки с симптомами ЗКГ, %			
Трихобласты		Контроль	Спермин	Спермидин	Путресцин
	Буфер	9,5±1,31	64,8±5,52***	42,9±5,40***	39,2±4,11***
	ДМСО	7,3±1,12	50,6±1,12***	21,9±2,55*a	7,6±1,27***a
	Тиомочевина	8,8±2,32	62,3±5,68***	31,6±5,37***	14,0±2,01***a
	Каталаза	8,1±1,24	77,3±3,64***	39,1±3,55***	6,2±1,22***a
	СОД	3,7±1,31	64,4±8,94***	11,1±3,50***a	1,8±1,08***a
Атрихобласты		Контроль	Спермин	Спермидин	Путресцин
	Буфер	1,7±0,41	14,5±1,07***	16,1±1,47***	10,7±1,24***
	ДМСО	5,0±1,90	19,9±1,47***	8,8±1,57	1,3±0,29***a
	Тиомочевина	3,6±1,34	24,7±2,01***,***a	11,6±1,99**	5,3±1,26
	Каталаза	5,9±1,65	41,0±3,31***,***a	23,6±3,06***	0,8±0,29***a
	СОД	1,5±0,50	29,8±1,89***,***a	10,0±1,89	0,6±0,62***a

Достоверность различий рассчитывали по отношению к контролю: * – $p < 0,01$, ** – $p < 0,001$, *** – $p < 0,0001$; к обработке полиаминами: *a – $p < 0,01$, ***a – $p < 0,0001$ (n=15).

Литература

1. *V.V. Demidchik [et al.] Arabidopsis root K⁺-efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death // J. Cell Sci. 2010. Vol. 123. № 1. P. 1468–1479.*
2. *Pottosin I. [et al.] Polyamines control of cation transport across plant membranes: implications for ion homeostasis and abiotic stress signaling // Front Plant Sci. 2014. Vol. 5. № 154. P. 1–16.*

КЛОНИРОВАНИЕ ГИБРИДНОГО ГЕНА *SUMO-ESC21A* В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*

Д. М. Янушкевич, Н. В. Совгир

ВВЕДЕНИЕ

Развитие антибиотикорезистентности бактерий повышает интерес к антимикробным пептидам (АМП) как новым перспективным средствам борьбы с патогенами. Однако, несмотря на довольно высокую биологическую активность АМП, лишь некоторые из них нашли практическое применение, в связи с чем, актуальны исследования по разработке новых биотехнологических способов получения АМП.

Активность АМП эскулентина-1a [7] в отношении многих видов патогенных бактерий и грибов обусловлена его N-концевой областью длиной 21 аминокислотный остаток (Esc21a) [3]. Традиционно в клетках *E.*

coli АМП получают в составе фьюжн-белков [4]. В качестве фьюжн-партнера рекомбинантного N-концевого фрагмента эскулентина-1а в работе выступает малый убиквитин-подобный модификатор (small ubiquitin-related modifier, SUMO) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Согласно литературным данным SUMO повышает уровень экспрессии и растворимость присоединяемых к нему белков [5].

Целью данной работы являлось клонирование гибридного гена *sumo-esc21a*, состоящего из генов малого убиквитин-подобного модификатора и N-концевого фрагмента эскулентина-1а, в клетках бактерий *E. coli*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Плазмида рЕТ-Esc-a(1-21) [2] содержала ген N-концевого фрагмента эскулентина-1а, клонированный по сайтам рестрикции *Nde* I и *Eco* RI. Плазмида рЕТ-HST содержала последовательность *sumo*, клонированную по сайту рестрикции *Nde* I. Плазмиды получены в НИЛ биотехнологии кафедры микробиологии БГУ.

Штамм *E. coli* XL-1Blue (F' *proABlacI^qlacZΔM15Tn10(Tc^r)/recA1 endA1gyrA96(Nal^r) thi-1 hsdR17supE44 relA1 lac*) из коллекции кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ использовали для клонирования рекомбинантной плазмиды.

Плазмидную ДНК выделяли набором «QIAGEN Spin Miniprep Kit (50)» («QIAGEN»), ДНК из агарозного геля – набором «Silica Bead DNA Gel Extraction Kit» («Thermo Scientific») согласно инструкциям производителей.

Аmplification фрагментов ДНК проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в смеси стандартного состава [6] с использованием полимеразы Taq («Thermo Scientific») и праймеров производства ОДО «Праймтех».

Электрофоретический анализ нуклеиновых кислот и кальциевую трансформацию бактериальных клеток проводили согласно стандартным методикам [1]. Данные, полученные в результате секвенирования плазмидных ДНК по методу Сэнгера, анализировали при помощи программы множественного выравнивания последовательностей Clustal Omega.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия гибридного гена *sumo-esc21a* в бактериальных клетках позволяет получить фьюжн-белок SUMO-Esc21a, который на N-конце содержит малый убиквитин-подобный модификатор *S. cerevisiae*,

снабженный полигистидиновой аффинной меткой для металл-хелатной хроматографии (6xHis), а на С-конце – целевой пептид Esc21a. Между белком-партнером и АМП находится сайт узнавания для TEV протеазы в целях отделения SUMO от пептида.

Для получения гибридного гена нуклеотидную последовательность *sumo* по сайту рестрикции *Nde* I вырезали из плазмиды рЕТ-HST и клонировали в составе вектора рЕТ-Esc-a(1-21). Далее рекомбинантной плазмидой рЕТ-*sumo-esc21a* трансформировали бактерии *E. coli* XL-1Blue.

Проверку клонов на наличие в составе плазмид клонированной гибридной последовательности осуществляли при помощи ПЦР с использованием фланкирующих праймеров для полилинкерной области плазмиды рЕТ24b(+). В качестве отрицательных контролей использовали пробу без ДНК-матрицы и пробу с интактной плазмидой рЕТ24b(+).

В результате электрофоретического анализа продуктов ПЦР установлено наличие генетической конструкции *sumo-esc21a* (ожидаемый продукт амплификации 670 п.н.) у одного клона из шести (рис. 1).

Поскольку последовательность *sumo* клонировали по одному сайту рестрикции, необходимо было проверить правильность ориентации вставки. Для чего ампликон *sumo-esc21a* обрабатывали рестриктазой *Nhe* I, сайт которой уникален для гибридного гена. Длина продуктов рестрикции ампликона составила 145 п.н. и 525 п.н., что соответствовало правильной ориентации вставки (рис. 2).

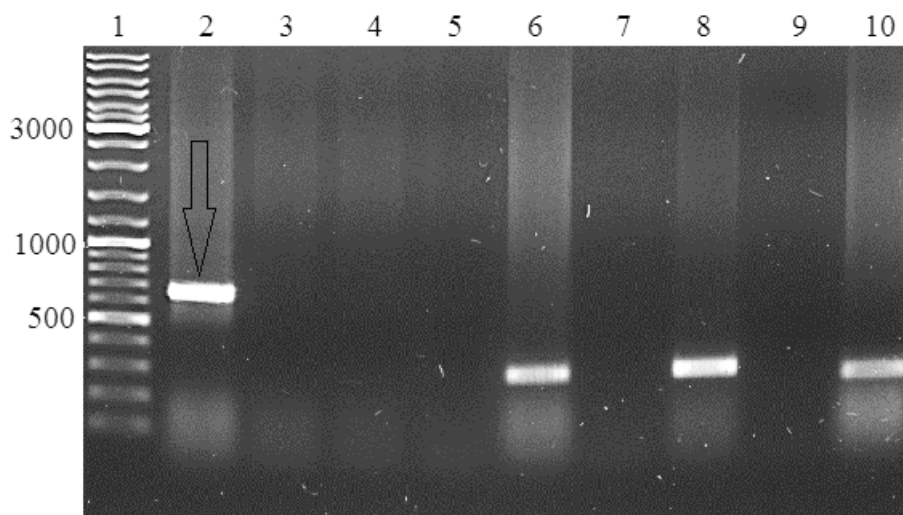


Рис. 1. Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа трансформантов *E. coli* XL-1Blue на наличие гена *sumo-esc21a* в составе плазмид

1 – маркер молекулярного веса SM0333 («Thermo Scientific»); 2 – трансформант, содержащий вставку; 3–8 – трансформанты, не содержащие вставку; 9 – отрицательный контроль (проба без ДНК-матрицы); 10 – отрицательный контроль (интактная плаزمида рЕТ24b(+))

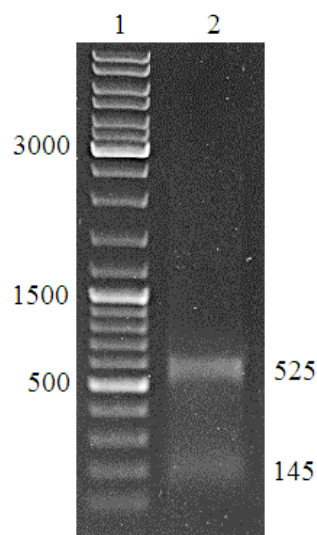


Рис. 2. Электрофореграмма результатов рестрикционного анализа амплифицированного фрагмента *sumo-esc21a*

1 – маркер молекулярного веса SM0333 («Thermo Scientific»);

2 – ампликон с правильной ориентацией вставки, обработанный рестриктазой *Nhe* I.

Секвенирование выделенной плазмидной ДНК по методу Сэнгера подтвердило правильность нуклеотидной последовательности клонированного гена.

Таким образом, в результате проведенной работы в клетках бактерий *E. coli* в составе вектора для экспрессии клонирован гибридный ген *sumo-esc21a*, не содержащий по данным секвенирования нуклеотидных замен.

Литература

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование // Под ред. А.А. Баева. М.: Мир.1984. 480 с.
2. Нагорная А. А. Совгир Н. В. Клонирование N-концевых фрагментов антимикробного пептида эскулентина // Сборник работ 72-й научной конференции студентов и аспирантов Белорусского государственного университета: В 3 ч. Ч.1. БГУ, 2015. С. 247–250.
3. Islas-Rodriguez A. E., Marcellini L., Orioni B., Barra D., Stella L., Mangoni M. L. Esculentin 1-21: a linear antimicrobial peptide from frog skin with inhibitory effect on bovine mastitis-causing bacteria // J. Pept. Sci. 2009. No 15. P. 607–614.
4. Li Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in Escherichia coli: a review // Protein Expr. Purif. 2011. Vol. 80, No 2. P. 260–267.
5. Marblestone J. G., Edavettal S. C., Lim Y., Lim P., Zuo X., Butt T. R. Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO // Protein Sci. 2006. Vol. 15, No 1. P. 182–189.
6. McPherson M. J., Møller S. G. PCR // Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2000. 276 p.
7. Simmaco M., Mignogna G., Barra D., Bossa F. Antimicrobial peptides from skin secretion of *Rana esculenta*. Molecular cloning of cDNA encoding esculentin and brevinins and isolation of new active peptides // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269, No 16. P. 11956–11961.