

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра микробиологии**

Янушкевич
Дарья Максимовна

**ПОЛУЧЕНИЕ N-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА АНТИМИКРОБНОГО
ПЕПТИДА ЭСКУЛЕНТИНА В СОСТАВЕ ФЬЮЖН-БЕЛКА В
КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI***

Аннотация
к дипломной работе

Научный руководитель:
ассистент, Н.В. Совгир

Минск, 2017

АННОТАЦИЯ

Объект исследования: гибридная нуклеотидная последовательность, детерминирующая синтез фьюжн-белка, состоящего из малого убиквитин-подобного модификатора дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и лягушачьего антимикробного пептида эскулентина-а(1–21).

Целью данной работы является получение N-концевого фрагмента антимикробного пептида эскулентина-1а – эскулентина-а(1–21) в составе фьюжн-белка в клетках бактерий *E. coli* для дальнейшего ферментативного отделения пептида от белка-партнёра и проверки антибактериальной активности пептида.

В ходе работы получена гибридная генетическая последовательность, кодирующая фьюжн-белок, который на N-конце содержит малый убиквитин-подобный модификатор *Saccharomyces cerevisiae*, снабжённый полигистидиновой аффинной меткой для металл-хелатной хроматографии, а на С-конце – пептид эскулентин-а(1–21). Между модификатором и пептидом находится сайт узнавания для TEV протеазы в целях отделения последнего от партнера. В результате проведённой индукции экспрессии выявлено накопление в клетках штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL белкового продукта, по массе соответствующего фьюжн-белку, преимущественно в растворимой форме при оптимальной для культивирования штамма температуре. В результате металл-хелатной хроматографической очистки получен препарат фьюжн-белка. При помощи металл-хелатной хроматографии также получен препарат TEV протеазы для отделения пептида эскулентина-а(1–21) от белка-партнёра. После инкубирования растворов TEV протеазы и фьюжн-белка и последующего электрофоретического анализа установлено наличие ферментативной активности TEV протеазы в отношении фьюжн-белка. Также установлено проявление антибактериальной активности освободившегося от белка-партнёра пептида эскулентина-а(1–21) в отношении бактерий *Pseudomonas aeruginosa*.

**MINISTRY OF EDUCATION OF THE REPUBLIC OF BELARUS
BELARUSIAN STATE UNIVERSITY
BIOLOGICAL FACULTY
Department of Microbiology**

Yanushkevich
Darya Maksimovna

**TO OBTAIN THE N-TERMINAL FRAGMENT OF THE
ANTIMICROBIAL PEPTIDE ESCULENTIN AS THE PART OF THE
FUSION PROTEIN IN *E. COLI***

Annotation
to the diploma work

Scientific supervisor:
assistant N.V. Sovgir

Minsk, 2017

ANNOTATION

The object of the study is hybrid nucleotide sequence determining fusion protein synthesis. It consists of a small ubiquitin-related modifier *Saccharomyces cerevisiae* and frog antimicrobial peptide esculentin-a(1–21).

The aim of this study is to obtain the N-terminal fragment of the antimicrobial peptide esculentin-1a – esculentin-a(1–21) as the part of the fusion protein in *E. coli* for further fermentative separation of the peptide from the partner protein and check antibacterial activity of the peptide.

In the course of the work a hybrid genetic sequence encoding a fusion protein that at the N-terminus contains a small ubiquitin-like *Saccharomyces cerevisiae* modifier, equipped with a polyhistidine affinity tag for metal-chelate chromatography, and at the C-terminus, an esculentin-a (1- 21). Between the modifier and the peptide is a recognition site for TEV protease in order to separate the latter from the partner. As a result of the induction of expression, the accumulation of the *E. coli* strain BL21-CodonPlus (DE3) -RIPL protein product, by weight of the corresponding fusion protein, predominantly in soluble form at an optimum temperature for culturing the strain was detected in the cells. As a result of metal-chelate chromatographic purification, a fusion protein preparation was obtained. Metal chelate chromatography also produced a TEV protease preparation to separate the peptide esculentin-a (1-21) from the partner protein. After incubating TEV protease and fusion protein solutions and subsequent electrophoretic analysis, the enzymatic activity of the TEV protease against the fusion protein was determined. The manifestation of antibacterial activity of esculentin-a peptide (a 1-21), released from the partner protein, against *Pseudomonas aeruginosa* bacteria was also established.

**МІНІСТЭРСТВА АДУКАЦЫІ РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ
БЕЛАРУСКІ ДЗЯРЖАЎНЫ ЎНІВЕРСІТЭТ
БІЯЛАГІЧНЫ ФАКУЛЬТЭТ
Кафедра мікрабіялогіі**

Янушкевіч
Дар'я Максімаўна

**АТРЫМАННЕ N-КАНЦАВОГА ФРАГМЕНТА
АНТЫМІКРОБНАГА ПЕПТЫДА ЭСКУЛЕНЦІНА Ў СКЛАДЗЕ
ФЬЮЖН-БЯЛКА Ў КЛЕТКАХ *E.COLI***

Анатацыя
да дыпломнай працы

Навуковы кіраўнік:
асістэнт, М.В. Совгир

Мінск, 2017

АНАТАЦЫЯ

Аб'ектам даследавання з'яўляецца гібрыдная нуклеатыдная паслядоўнасць, якая дэтэрмінуе сінтэз фьюжн-бялка, які складаецца з малога ўбіквіцін-падобнага мадыфікатара *Saccharomyces cerevisiae* і антымیکробнага пептыда эскуленціна-а(1–21).

Мэтай дадзенай працы з'яўляецца атрыманне N-канцавога фрагмента антымیکробнага пептыда эскуленціна-1a - эскуленціна-а(1–21) у складзе фьюжн-бялка ў клетках бактэрыі *E. coli* для далейшага ферментатыўнага аддзялення пептыда ад бялка-партнёра і праверкі антыбактэрыяльнай актыўнасці пептыда.

У ходзе працы атрымана гібрыдная генетычная паслядоўнасць, якая кадуе фьюжн-бялок, які на N-канцы ўтрымлівае малы ўбіквіцін-падобны мадыфікатар *Saccharomyces cerevisiae*, забяспечаны полігістыдынавай афіннай пазнакай для метал-хелатнай храматаграфіі, а на C-канцы - пептыд эскуленціна-а (1- 21). Паміж мадыфікатарам і пептыдам знаходзіцца сайт пазнавання для TEV пратэазы ў мэтах аддзялення апошняга ад партнёра. У выніку праведзенай індукцыі экспрэсіі выяўлена назапашванне ў клетках штаму *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) -RIPL бялковага прадукта, па масе адпаведнага фьюжн-бялку, пераважна ў растваральнай форме пры аптымальнай для культывавання штаму тэмпературы. У выніку метал-хелатнай храматаграфічнай ачысткі атрыманы прэпарат фьюжн-бялка. Пры дапамозе метал-хелатнай храматаграфіі таксама атрыманы прэпарат TEV пратэазы для аддзялення пептыда эскуленціна-а (1-21) ад бялку-партнёра. Пасля інкубавання раствораў TEV пратэазы і фьюжн-бялка і наступнага электрофарэтычнага аналізу ўстаноўлена антыбактэрыяльная актыўнасць пептыда эскуленціна-1a(1–21), аддзяленага ад бялка-партнёра ў дачыненні да клетак бактэрыі *P. aeruginosa*.