

Секция «Биоинженерия и биоинформатика»

Субклонирование и экспрессия гена металлопротеиназы mprVp *Bacillus pumilus*

Игонина Ольга Николаевна

Студент

Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина,

Биолого-почвенный факультет, Казань, Россия

E-mail: igoninaolga@yandex.ru

В геноме бактерий *Bacillus pumilus* 3-19 идентифицирован ген металлопротеиназы mprVp, продукт которого является первым белком-представителем клана метцинкинов у бацилл. Присутствие этого метцинкина составляет менее 1% от общей протеолитической активности клеток. Известно, что в клетках высших организмов эукариотические метцинкины ответственны за возникновение воспалительных процессов, неврологических расстройств, кардиозаболеваний, обширного метастазирования при онкологических заболеваниях, кроме того, ферменты класса метцинкинов играют ключевую роль в регуляции активности цитокининов, факторов роста и других протеиназ через механизм ограниченного протеолиза. Изучение функциональной роли бактериальных метцинкинов может иметь не только фундаментальный, но и практический интерес. Очистка с помощью ионообменной хроматографии до сих пор не привела к желаемому выходу фермента. Поэтому, для получения высокоочищенного гомогенного препарата металлопротеиназы *B. pumilus* 3-19, ген фермента (mprVp) был клонирован в клетках *B. subtilis* и *Escherichia coli*. Методика клонирования включала выделение: кодирующего региона зрелого белка - mprVp (1), зрелого белка и пропептида - PP+mprVp (2), а также всей структурной области гена - SP+PP+mprVp (3). ПЦР продукты трёх комбинаций экспрессировались на мультикопийных плаزمиде рKLD66 и рGP380. Оба вектора несут аффинные метки (6His-tag и Step-tag соответственно) и сильные промоторы. Отличительной характеристикой вектора рKLD66 является также наличие гена мальтозасвязывающего белка (МСБ), который способствует повышению растворимости синтезируемого белка и делает его более стабильным, а также наличие сайта TEV-протеазы для последующего отщепления МСБ и 6His-tag метки. Секвенирование конструкций показало корректное встраивание всех комбинаций гена mprVp в выбранные вектора, а некоторые замены нуклеотидов не привели к сдвигу рамки считывания гена или смены аминокислот. Использование такого подхода поможет выявить экспрессионную систему с максимальным выходом и наименее токсичным эффектом металлопротеиназы.