

ПОЛУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА UBI₁₈₋₃₅ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕКОМБИНАНТНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Д.О. Ащеулова (Бурлакова)

Научный руководитель: доцент, к.б.н., А.Г. Першина

Национальный исследовательский Томский политехнический университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 30, 634050

E-mail: bur-dar@mail.com

RECOMBINANT UBI₁₈₋₃₅ PEPTIDE PRODUCTION

D.O. Ascheulova (Burlakova)

Scientific Supervisor: As. prof., Dr. A.G. Pershina

Tomsk Polytechnic University, Russia, Tomsk, Lenin str., 30, 634050

E-mail: bur-dar@mail.com

***Annotation.** Currently, short peptides are widely used in diagnostics. These molecules not only provide the high-avidity binding with target cells but also have smaller sizes in comparison with the proteins. Peptides are nearly invisible to the immune system and are expected to cause minimal or no side effects. Compared with isolation from natural sources and chemical synthesis, recombinant approach offers the most cost-effective technology for large-scale peptide manufacture. The aim of this work was to obtain the recombinant *E.coli* strain, transformed by vector construction, encoding expression of UBI₁₈₋₃₅ peptide. The UBI₁₈₋₃₅ antimicrobial peptide labeled radionuclide marker can be applied for detection of pathological processes arising from microbial infection.*

Актуальность

Проблема ранней диагностики заболеваний в последнее время приобретает все большую актуальность. Перспективным направлением является использование коротких пептидов в качестве векторных молекул для целевой доставки контрастного агента, что связано, в первую очередь, с их низкой иммуногенностью [1, 2]. Так, на основе производных антимикробного пептида убиквицидина (UBI) предложен подход к высокоэффективной дифференциальной диагностике микробного воспаления [3]. В настоящее время короткие пептиды получают методом твердофазного синтеза, однако он является трудоемким и высокзатратным. Для масштабирования процесса наработки пептида с целью создания диагностических систем экономически более перспективным представляется метод микробного синтеза с использованием рекомбинантных технологий. Для успешной реализации данного подхода необходимо избежать риски протеолитической деградации пептида внутри микробной клетки и предотвратить негативные эффекты, вызванные пептидом в отношении клетки-продуцента [4]. Целью данной работы было получить вектор для экспрессии АМП UBI₁₈₋₃₅ и оптимизировать условия экспрессии пептида в клетках *E.coli*.

Материалы и методы

Для получения кодирующей пептид последовательности был выполнен дизайн и синтезированы соответственно две пары олигонуклеотидов (ЗАО Биосинтез) с областью перекрытия 20 п.о., с последующим достраиванием их до двухцепочечной молекулы методом ПЦР. Для преодоления рисков

накладываемых антимикробной активностью пептида, для клонирования UBI₁₈₋₃₅ был выбран вектор pET31b+ (Novagen) обеспечивающий экспрессию пептида в составе белка-слияния с кетостероидизомеразой. Клонирование проводили по стандартным протоколам, рестрикцию, дефосфорилирование проводили согласно инструкции фирмы-производителя (СибЭнзим), выделение и очистку ДНК проводили коммерческими наборами (Evrogen). Успешность получения рекомбинантной плазмиды, содержащей кодирующий пептид участок, была подтверждена методом секвенирования на базе НИИ Генетики (г. Томск) с T7 праймерами (ABI 3130XL, Applied Biosystems). Целевой пептид в составе белка-слияния с кетостероидизомеразой (KSI) экспрессировали в штамме *E.coli* Rossetta DE3 pLysS при варьировании температуры от 25 до 37°C и концентрации ИПТГ от 0.1 mM до 1 mM. В качестве контроля использовали культуры клеток трансформированные плазмидой, не несущей ген целевого пептида. Визуализацию и количественную оценку пептида в составе белка-слияния проводили методом SDS-PAGE электрофореза. Вестерн-блот проводили с антителами Anti-His₆-Peroxidase (Roche) и последующей хемилюминесцентной регистрацией ChemiFast (Syngene). Очистка целевого пептида в составе белка-слияния осуществлялась методом металл-аффинной хроматографии на NiNTA-агарозе (Qiagen).

Результаты

Нами был получен рекомбинантный плазмидный вектор, направляющий продукцию антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅ (Рис. 1). Установлено, что успешное клонирование достигается только при условии дублирования вставки (в исходной синтетической последовательности).

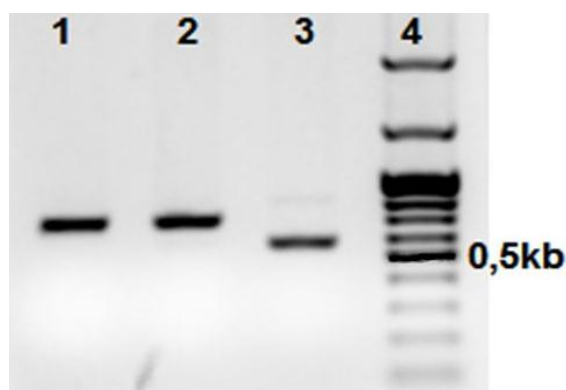


Рис.1. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР. Дорожки: 1, 2 – pET31b-2xUBI₁₈₋₃₅ (677 п.о.), 3 – pet31b (~560п.о.), 4 – маркер молекулярного веса M12 (СибЭнзим).

Максимальный уровень экспрессии рекомбинантного пептида в составе белка-слияния с кетостероидизомеразой наблюдали при температуре 28°C и 0.5 mM концентрации ИПТГ (Рис. 2).

Результаты вестерн-блот анализа (Рис.2. В) показали, что до индукции наблюдается экспрессия белка на базальном уровне. Для предотвращения преждевременной транскрипции с T7 промотора клетки выращивали в LB среде с добавлением глюкозы (1% от объема среды) [5], при этом отмечали полное прекращение экспрессии белка до индукции, что было подтверждено вестерн-блот анализом. Целевой пептид в составе белка-слияния был выделен и очищен методом металл-аффинной хроматографии.

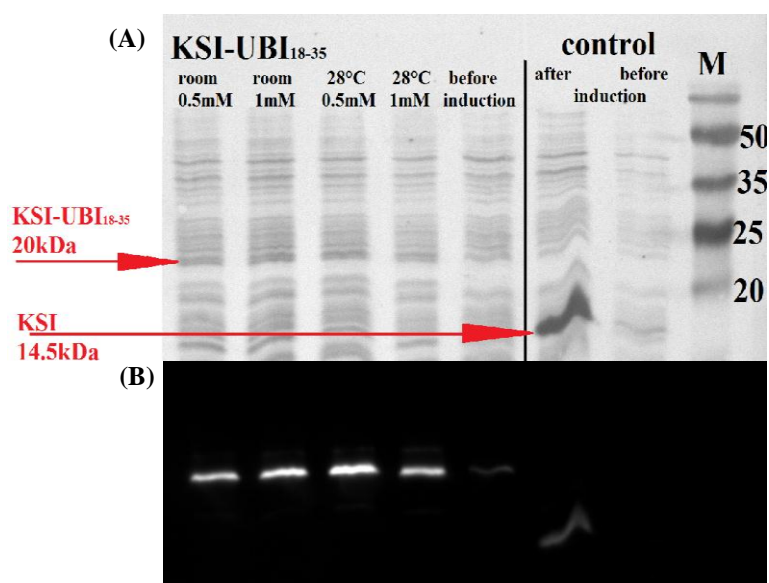


Рис.2. (A) SDS-PAGE электрофорез и (B) Вестерн-блот анализ UBI_{18-35} экспрессированного в составе белка слияния с KSI при варьировании температуры и концентрации ИПТГ.

Заключение

Получен штамм *E.coli* Rossetta DE3 pLysS для экспрессии рекомбинантного антимикробного пептида UBI_{18-35} в составе белка-слияния с кетостероидизомеразой (KSI). Подобраны оптимальные условия экспрессии, осуществлена очистка рекомбинантного пептида в составе белка-слияния.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bidwell G.L. Peptides for Cancer Therapy – A Drug Development Opportunity and a Drug. Delivery Challenge // *Therapeutic Delivery*. – 2012. – Vol. 3. – № 5. – P. 609-621.
2. Fani M. et. al. Radiolabeled Peptides: Valuable Tools for the Detection and Treatment of Cancer // *Theranostics*. – 2012. – Vol. 2. – № 5. – P. 481-501.
3. Akhtar M.S. et. al. Antimicrobial Peptide ^{99m}Tc -Ubiquicidin 29 – 41 as Human Infection-Imaging Agent: Clinical Trial // *The journal of nuclear medicine*. – 2005. – Vol. 46. – № 4. – P. 567-573.
4. Zorko M. et. al. Production of Recombinant Antimicrobial Peptides in Bacteria // *Antimicrobial Peptides. Methods in Molecular Biology*. – 2010. – Vol. 618. – P. 61-76.
5. Novy R. et. al. Use of glucose to control basal expression in the pET System // *Novagen, Inc.* – 2013. – P. 8-10.