

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-323

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО БЕЛОК С LYSM-МОТИВОМ, ИЗ *PIERIS RAPAE* В *ESCHERICHIA COLI**

A GENE ENCODING A LYSM MOTIF-CONTAINING PROTEIN FROM *PIERIS RAPAE* EXPRESSION IN *ESCHERICHIA COLI*

Е. Г. Ерохина, Е. Ю. Эпова, Е. В. Трубникова, Е. Д. Никольская, И. Н. Курочкин

Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва

E. G. Erokhina, E. Yu. Epova, E. V. Trubnikova, E. D. Nikolskaya, I. N. Kurochkin

Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow

✉ kate_sh_1@mail.ru

Аннотация

В работе проведено клонирование гена, кодирующего белок с мотивом LysM, из бабочки *Pieris rapae* в экспрессионный вектор pET-28b(+). Полученной плазмидой трансформировали клетки *E. coli* Tuner (DE3). В ходе ферментации полученных трансформантов были подобраны оптимальные условия для экспрессии целевого гена: конечная концентрация IPTG — 0,1 mM, время индукции — 4 ч, температура — 37 °C.

Abstract

In this study the gene encoding a LysM motif-containing protein from *Pieris rapae* was cloned into the pET-28b(+) expression vector. The plasmid with target gene was used to transform *E. coli* Tuner (DE3) cells. During fermentation of the obtained transformants optimal conditions for target gene expression were determined: final IPTG concentration — 0,1 mM, induction time — 4 h, temperature — 37 °C.

В настоящее время в связи с массовым и бесконтрольным использованием антибиотиков в медицине, сельском хозяйстве и других отраслях проблема быстрого распространения антибиотикорезистентности среди бактериальных популяций приобрела широкий масштаб. В этой связи актуальность приобретает создание высокочувствительных диагностических систем для раннего выявления инфекций, что позволит при необходимости

применять препараты узкого спектра действия против конкретного возбудителя [1, 2]. На ранних этапах развития бактериальной инфекции биологические жидкости организма содержат небольшое количество бактериальных клеток, которые можно концентрировать с помощью функционализированных магнитных частиц, покрытых молекулами, связывающимися с компонентами бактериальной мембраны или клеточной стенки [3].

Для получения функционализированных магнитных частиц мы предлагаем использовать белок из бабочки *P. rapae*, содержащий мотив LysM. Белки с мотивом LysM широко распространены у различных видов бактерий, фагов, растений и животных [2]. Мотив LysM представляет собой функциональный домен из 40–65 аминокислот, который может связываться с углеводами, содержащими N-ацетилглюкозамин, такими как пептидогликаны, хитин и их производные [1].

Цель настоящей работы — клонирование гена, кодирующего белок из *P. rapae*, содержащий LysM-мотив, его экспрессия в *E. coli* и подбор оптимальных условий ферментации для максимального выхода белка.

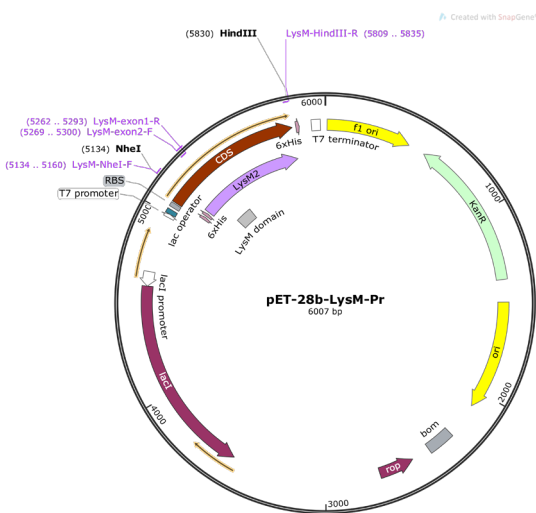


Рис. 1. Карта плазмиды pET-28b-LysM-Pr, предназначенной для экспрессии белка с мотивом LysM из *P. rapae* в клетках *E. coli*

* Исследование выполнено в рамках государственного задания № 1240613000029 по теме «Создание химикоаналитических систем на основе сверхчувствительных методов нанофотоники для мониторинга биологических рисков и предотвращения связанных с ними угроз».

Ген, кодирующий белок с мотивом LysM (230 а. о.), был получен из хромосомы *P. rapae* методом ПЦР с перекрывающимися праймерами и клонирован в вектор pET-28b(+) по сайтам NheI/HindIII (рис. 1).

Наличие LysM-мотива было подтверждено секвенированием по Сэнгеру.

Полученную плазмиду pET-28b-LysM-Pr трансформировали в клетки *E. coli* Tuner (DE3). Трансформанты высевали на среду с канамицином в конечной концентрации 50 мкг/мл и проверяли на наличие pET-28b-LysM-Pr методами ПЦР и рестрикции.

Для определения наилучших условий экспрессии целевого гена в клетках *E. coli* Tuner (DE3)/pET-28b-LysM-Pr ставили ряд ферментаций, в которых различались температура (30 и 37 °C), концентрация IPTG (0,1, 0,2 и 1 мМ) и время индукции (2, 4 и 20 ч).

После завершения ферментаций проводили белковый электрофорез (рис. 2) в 12%-м полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. В качестве образцов использовали отмывтую в физрастворе биомассу клеток. Белки окрашивали с использованием 0,1%-го раствора кумасси голубого R250.

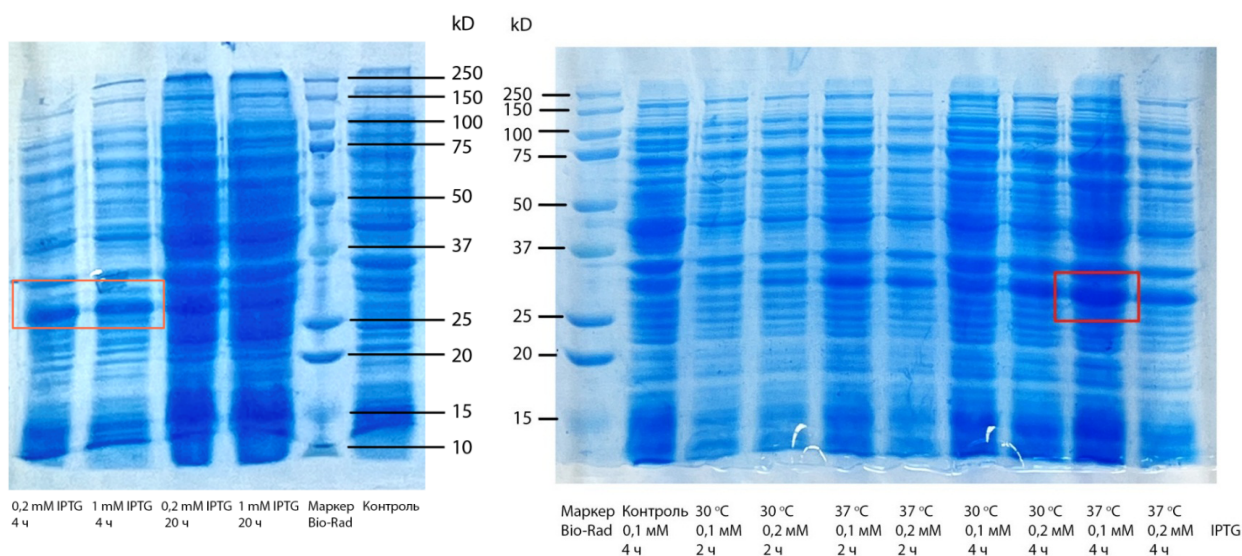


Рис. 2. Электрофорез общего белка трансформантов *E. coli* Tuner (DE3)/pET-28b-LysMPr. Красной рамкой выделена полоса, соответствующая целевому белку, расчетная молекулярная масса которого составляет 28,2 kDa

Анализ электрофореграмм показал, что рекомбинантный белок экспрессируется в клетках *E. coli* Tuner (DE3). Максимальный выход целевого продукта наблюдается в случае индукции работы T7-промотора 0,1 мМ IPTG в течение 4 ч и культивировании при 37 °C (см. рис. 2).

Литература

1. Buist G., Steen A., Kok J., Kuipers O. P. LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans // *Molecular Microbiology*. 2008. Vol. 8, No. 4. P. 838–847.
2. Visweswaran G. R., Leenhouts K., van Roosmalen M. et al. Exploiting the peptidoglycan binding motif, LysM, for medical and industrial applications // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014. Vol. 98, No. 10. P. 4331–4345.
3. Elhariry M. et al. Nanomaterials for bacterial enrichment and detection in healthcare // *Nanomedicine*. 2025. Vol. 20, No. 9. P. 985–1000.