

**Миронова Д.<sup>1</sup>, Казловский И.<sup>2</sup>, Бельская И.<sup>3</sup>, Зинченко А.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ,  
г. Минск, Республика Беларусь*

<sup>2</sup>*Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь*

<sup>3</sup>*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, г. Минск, Республика Беларусь*

## **Создание генетической конструкции, содержащей ген бактериальной кератиназы**

**Введение.** Кератины представляют собой нерастворимые в воде фибриллярные белки, которые являются главной компонентой покровной системы человека и животных [1]. Из всех ороговевших отходов самое большое количество кератина содержат перья. Они в большом количестве образуются при обработке домашней птицы, накапливаются в окружающей среде и представляют одну из значительных угроз экосистеме вследствие их устойчивости к процессам биологического разложения. Общепринятые приемы ликвидации кератиносодержащих отходов, такие как сжигание, закапывание в грунт и гидролиз трудоемки, потребляют много энергии, не экологичны, и разрушают некоторые эссенциальные аминокислоты. Перечисленные проблемы превращают разработку биологического метода разложения кератиновых отходов в насущную задачу. [2].

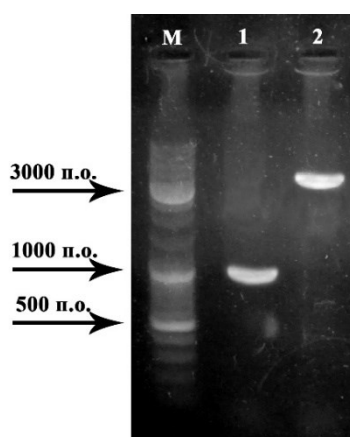
По сравнению с другими методами, у микробного разложения кератина [3] есть огромные преимущества, поскольку этот экологичный метод может обеспечивать получение ряда ценных продуктов. Однако, недостатком ферментативных процессов деструкции кератина является сравнительно высокая стоимость кератиназ. Одним из возможных подходов для ее снижения в литературе рассматривается применение рекомбинантных сверхпродуцентов этих ферментов.

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы явилось получение генетической конструкции, содержащей ген, кодирующий кератиназу, в качестве этапа создания рекомбинантного бактериального штамма, продуцирующего высокоактивную кератиназу.

**Методы исследования.** Основой для создания генетической конструкции с геном, кодирующим кератиназу являлся вектор рЕТ42а(+) (Novagen, США), несущий ген устойчивости к канамицину *kanR*, T7-промотор, а также полилинкер с множественными сайтами клонирования. Ген кератиназы *kerA* был изолирован при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) из ДНК *Bacillus licheniformis*.

Полученный ген и линейную молекулу вектора отжигали друг на друга при помощи безлигазного клонирования [4], также известного как «метод продолжительной перекрывающейся ПЦР» (ПП-ПЦР). Плазмиду из бактериальных клеток выделяли путем щелочного лизиса [5]. Рестрикционный и ПЦР-анализ, а также секвенирование полученного клона проводили по стандартным методикам [5].

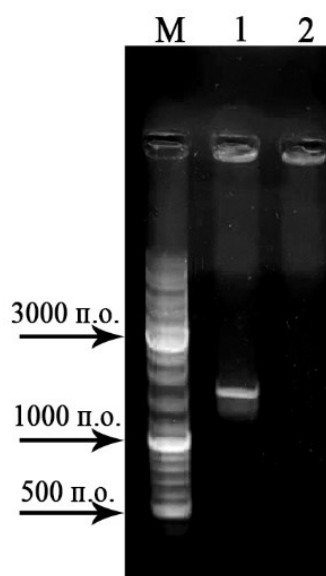
**Результаты исследования.** Ген *kerA* длиной 964 п.о. выделили из геномной ДНК *B. licheniformis* при помощи ПЦР. Затем проводили линейризацию вектора рЕТ-42а(+) длиной 4976 п.о. Полученные амплификаты анализировали при помощи 1% агарозного гель-электрофореза (рис. 1).



М – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК (здесь и далее).

**Рис. 1.** Электрофореграмма продуктов амплификации гена *kerA* (1) и коммерческого вектора рЕТ42а(+)

Далее при помощи полученных ранее гена и линейного вектора проводили постановку ПП-ПЦР. Полученной смесью трансформировали клетки *E. coli* XLBlue. ДНК, изолированную из выросших колоний бактериальных клеток, далее подвергли ПЦР-анализу для подтверждения наличия в ДНК целевого гена в правильной ориентации. Для этого использовали праймеры к последовательности T7-промотора и к последовательности, кодирующей кератиназу. Полученные результаты ПЦР-анализа представлены на рис. 2.



**Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа ДНК, изолированной из клеток-трансформантов**

Из данной электрофореграммы следует, что только в одной из двух колоний присутствует ген *kerA* в правильной ориентации. Такая колония была выбрана для дальнейшей работы.

Из выбранного штамма-трансформанта выделили плазмиды при помощи щелочного лизиса. Выделенную кольцевую молекулу подвергли рестрикции по сайту узнавания рестриктазы *Hind*III и секвенированию, для проверки факта отсутствия нежелательных спонтанных мутаций, появившихся в гене кератиназы. По результатам этих анализов был сделан вывод о том, что полученная линейная

молекула ДНК соответствует теоретически рассчитанной массе – 5957 п.о. и полинуклеотидная последовательность, кодирующая кератиназу, совпадает с первоначальной последовательностью гена *kerA*.

Полученную конструкцию можно использовать в дальнейшем для создания рекомбинантного штамма *E. coli*, продуцирующего кератиназу *B. licheniformis*.

#### Литература:

1. Keratin: structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration / B. Wang [et al.] // *Progr. Mater. Sci.* – 2016. – Vol. 76. – P. 229–318.

2. Подосокорская, О.А. Переработка отходов птицефабрик: современные подходы и перспективы / О.А. Подосокорская // *Электронный научный журнал Курского государственного университета.* – 2017. – № 3. – С. 1–7.

3. Lange, L. Microbial decomposition of keratin in nature – a new hypothesis of industrial relevance / L. Lange [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2016. – Vol. 100. – P. 2083–2096.

4. Quan, J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways / J. Quan, J. Tian // *PloS ONE.* – 2009. – Vol. 4, № 7. – P. 6441–6442.

5. Green, M.R. Molecular cloning. A laboratory manual. Fourth edition / M.R. Green, J. Sambrook // *Cold Spring Harbor Lab. Press, New York.* – 2012. – 630 p.