

## ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ АНТИ-RM14 И АНТИ-RM42 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ИЗУЧЕНИИ ЭКСПРЕССИИ МЕТАЛЛОПРОТЕАЗ M14 И M42 КЕРАТИНОЛИТИЧЕСКОГО ШТАММА *BACILLUS PARALICHENIFORMIS*

Мадухасова А.К.<sup>1,2</sup> , Мусахметов А.С.<sup>1</sup> , Акишев Ж.Д.<sup>1</sup> , Актаева С.А.<sup>1,2</sup> , Хасенов Б.Б.<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>Национальный центр биотехнологии, Кургальжинское шоссе, 13/5, Астана, 010000;

<sup>2</sup>Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, улица К. Сатпаева, 2, Астана, 010008.

\*khassenov@biocenter.kz

### АБСТРАКТ

В настоящем исследовании успешно клонированы, экспрессированы и очищены две металлопротеазы M14 и M42 из казахстанского штамма *Bacillus paralicheniformis* T7, обладающего высокой протеолитической активностью. Гены протеаз были амплифицированы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием специфических праймеров, подобранных на основе данных полногеномного секвенирования штамма *B. paralicheniformis* T7 (GenBank accession # CP124861). Амплифицированные фрагменты были клонированы в экспрессионном векторе pET-28c(+). Посредством плазмидной экспрессии в клетках *Escherichia coli* штамма ArcticExpressRP(DE3) были получены рекомбинантные аналоги металлопротеаз M14 и M42. С использованием металлоаффинной хроматографии были очищены белки rM14 и rM42, с помощью которых путем иммунизации кроликов были получены поликлональные антитела. С помощью антител анти-rM14 и анти-rM42 был исследован уровень экспрессии нативных металлопротеаз M14 и M42 в клеточном лизате и культуральной жидкости штамма *B. paralicheniformis* T7, после культивирования штамма на кератинсодержащих средах: курином пере, роге, копыте, шкуре и шерсти крупного рогатого скота. Установлена субстрат-зависимая экспрессия генов металлопротеаз штамма *B. paralicheniformis* T7. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования штамма *B. paralicheniformis* T7 в качестве продуцента металлопротеаз M14 и M42.

Ключевые слова: протеазы, антитела, *Bacillus paralicheniformis*, рекомбинантный белок, металлопротеазы, M14, M42.

### ВВЕДЕНИЕ

Протеолитические ферменты представляют собой обширный класс гидролаз, катализирующих расщепление пептидных связей в белках и пептидах [1]. Протеазы играют ключевую роль в разнообразных биологических процессах, включая пищеварение, регуляцию клеточного цикла, иммунный ответ, свертывание крови [2]. Благодаря своему широкому спектру действия и высокой специфичности, протеазы находят широкое применение в биотехнологии, медицине, пищевой и легкой промышленности [3]. Бактерии являются одним из основных источников протеолитических ферментов, используемых в промышленности [2]. Среди бактериальных продуцентов протеаз особое место занимает род *Bacillus*, представители которого способны секретировать широкий спектр протеаз с различными свойствами и субстратной специфичностью [4]. Среди представителей *Bacillus*, *Bacillus paralicheniformis*, известен своей способностью продуцировать разнообразные внеклеточные ферменты, включая протеазы, амилазы, липазы и другие [5, 6]. Ряд ферментов, продуцируемых данным видом, являются термостабильными и щелочными. Протеолитические ферменты *B. paralicheniformis* активно исследуются в связи с их потенциальным применением в различных областях, таких как производство моющих средств, пищевая промышленность, обработка кожи, в качестве биокатализаторов для синтеза пептидов и других биологически активных соединений [7, 8].

Среди бактериальных протеаз особое внимание привлекают металлопротеазы, которые характеризуются наличием ионов металлов (обычно цинка) в активном центре [9]. Бациллярные металлопротеазы обладают высокой активностью и специфичностью к различным белковым

субстратам, включая кератин, коллаген и казеин. Эти свойства делают их перспективными ферментами для применения в процессах биodeградации кератинсодержащих отходов [10, 11].

В данной работе мы представляем результаты исследования, посвященного клонированию, экспрессии генов и очистке двух металлопротеаз M14 и M42 из штамма *Bacillus paralicheniformis* T7. Путем иммунизации кроликов были получены и очищены поликлональные антитела, с помощью которых были идентифицированы нативные протеазы M14 и M42 в секреторных протеомах *B. paralicheniformis* T7 после культивирования клеток на различных отходах кератинсодержащего сырья: перьев, рога, копыта, шкуры, шерсти крупного рогатого скота. Полученные результаты свидетельствуют о высоком потенциале использования штамма *B. paralicheniformis* T7 в качестве продуцента протеолитических ферментов.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы, вектора, олигонуклеотиды

В работе использовали штамм *B. paralicheniformis* T7, выделенный из почвы близ г. Тараз, с выраженной протеазной и кератиназной активностью и депонированный в коллекции микроорганизмов Национального центра биотехнологии за номером В-NCB 0704. Для сборки генно-инженерной конструкции и размножения плазмиды использовался штамм *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , в качестве экспрессионного штамма использовался штамм *Escherichia coli* ArcticExpressRP(DE3).

Для плазмидной экспрессии генов был использован вектор pET-28c(+) (Novogen, USA). Для клонирования генов *m14* и *m42* использовались олигонуклеотиды, синте-

зированные в компании LumiProbe (Россия):

M14fw (5'-CGCGGATCCGGATGGCGGAAACCCCTTACTATGG-3');

M14rv (5'-CCGCTCGAGTTATTCCTTAACGTTAAGCGTTTTAG-3');

M42fw (5'-CGCGGATCCGGATGTCAGGACAGAAAACGCTG-3');

M42rv (5'-CCGCTCGAGTTATGCCATGTCAGACAGGAC-3').

Для отбора позитивных клонов методом ПЦР-скрининга и секвенирования вставки использовалась пара коммерческих праймеров T7fw (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') и T7rv (5'-GCTAGTTATGCTCAGCGG-3').

Реактивы, питательные среды

В работе использовались реактивы производства Sigma (St. Louis, MO, USA) и AppliChem (Darmstadt, Germany). Для культивирования штамма *B. paralicheniformis* T7 использовался питательный бульон (0,5% пептона, 0,5% NaCl, 0,15% дрожжевого экстракта, 0,15% мясного экстракта, pH 7.4). Для культивирования штаммов *E. coli* DH5 $\alpha$  и ArcticExpressRP(DE3) использовали бульон Луриа-Бертани (1% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 0,5% NaCl, pH 7,5) и агар на основе бульона Луриа-Бертани (1,5% агара, 1% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 0,5% NaCl, pH 7,5). Для отбора клонов-трансформантов использовали антибиотик канамицин в концентрации 50 мкг/мл.

Клонирование генов металлопротеаз M14 и M42

Культивирование штамма *B. paralicheniformis* T7 проводили на питательном бульоне в объеме 5 мл при 37°C в шейкере-инкубаторе при 180 об/мин в течение 16 часов. Клетки собирали центрифугированием при 6000  $\times$  g, в течение 7 минут при 4°C. Выделение геномной ДНК из клеток *B. paralicheniformis* T7 проводили с использованием набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA).

Гены *m14* и *m42* были амплифицированы из геномной ДНК *B. paralicheniformis* T7 с помощью олигонуклеотидов M14fw/M14rv и M42fw/M42rv, соответственно. Состав ПЦР: 100 нг геномной ДНК, 5X Phusion буфер, 2,5 mM смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, 10 мкМ каждого олигонуклеотида, 1,25 Ед Phusion ДНК полимеразы и 15,5 мкл безнуклеазной воды. Условия ПЦР: цикл 98°C в течение 3 мин; 25 циклов - 98°C в течение 30 секунд, 57°C в течение 45 секунд, 68°C в течение 45 секунд; 1 цикл - 68°C в течение 10 минут. Очистку амплифицированных генов от компонентов реакционной смеси проводили с помощью хлороформной экстракции с последующим осаждением этанолом. Амплифицированные гены *m14* и *m42* и вектор pET-28c(+) обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BamHI (Thermo Scientific, USA) и XhoI (Thermo Scientific, USA) в 2X Tango (Thermo Scientific, USA) в течение 3 часов в водяной бане при 37°C. Гидролизированные фрагменты ДНК очищали хлороформной экстракцией и лигировали с использованием T4 ДНК Лигазы (Thermo Scientific, USA) в течение 16 часов при 4°C. Полученной лигазной смесью обрабатывали компетентные клетки DH5 $\alpha$  по протоколу температурного шока. Отбор

положительных клонов проводили на ЛБ-агаре с канамицином. Клоны-трансформанты подвергали ПЦР-скринингу, позитивные клоны нарабатывали и выделяли плазмидную ДНК с использованием набора QIAGEN Plasmid Midi Kit (Hilden, Germany). Вставку в плазмидной ДНК секвенировали с использованием праймеров T7fw/T7rv.

Экспрессия генов в клетках *Escherichia coli*

Полученными генно-инженерными конструкциями были трансформированы компетентные клетки ArcticExpressRP(DE3) методом электропорации. Отбор клонов-трансформантов проводили на ЛБ-агаре с канамицином. Единичную культуру каждого рекомбинантного штамма культивировали в ЛБ-бульоне в объеме 200 мл при 37°C, в течение 3 часов и встряхивании 220 об/мин. В середине логарифмической фазы роста при OD<sub>600</sub>=0,6 добавляли 0,5 mM изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) и инкубировали в течение 16 часов при 30°C и встряхивании 150 об/мин. Образцы для анализа отбирали через 2, 4 и 16 часов после добавления ИПТГ. Клетки в образцах лизировали ультразвуком и анализировали в ПААГ-ДСН электрофорезе.

Хроматографическая очистка рекомбинантных металлопротеаз rM14 и rM42

Проводили наработку и индукцию рекомбинантных штаммов в объеме 600 мл. Клеточную массу собирали центрифугированием, суспендировали в 50 mM Нерес-КОН, (pH 8.0) с 300 mM NaCl и лизировали с помощью лизоцима в концентрации 2 мг/мл. Лизат осветляли центрифугированием при 18000  $\times$  g, 60 минут, 4°C. Осветленный лизат наносили на агарозную колонку Ni-NTA (Invitrogen, USA), предварительно уравновешенную суспендирующим буфером. Белки M14 и M42 элюировали ступенчатым градиентом по имидазолу 20-500 mM в 50 mM Нерес-КОН (pH 8.0) с 300 mM NaCl. Анализ фракций в элюатах проводили электрофорезом в ПААГ-ДСН.

Определение концентрации белка

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [12] с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта. Вкратце, смешивали 100 мкл реагента Бредфорда (краситель для белкового анализа; Bio-Rad, Мюнхен, Германия) и 860 мкл 10% PBS с 1% глицерина и добавили 40 мкл образца белка. Смесь инкубировали 2 мин при комнатной температуре и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при 595 нм.

Иммунизация кроликов, получение и очистка поликлональных антител анти-rM14 и анти-rM42

Для иммунизации использовали кроликов - самцов в возрасте 5 месяцев. Перед иммунизацией в качестве отрицательного контроля отбирали 1 мл крови из ушной вены. Первую иммунизацию кроликов проводили смесью очищенного белка rM14 или rM42 с полным адьювантом Фрейнда в соотношении 1:1 (общий объем 1 мл). Концентрация белка при первой иммунизации составляла 300 мкг/мл. Для второй иммунизации кроликов очищенный белок смешивали с неполным адьювантом Фрейнда (1:1). При последующих иммунизациях концентрация белка составляла 150 мкг/мл. Антиген вводили подкожно в двух точках вдоль позвоночника. Интервал между прививками составлял 7 дней.

Выделение иммуноглобулинов осуществляли высаливанием в  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . К сыворотке добавляли сульфат аммония до получения 28% -ного насыщенного раствора и инкубировали при 4°C в течение 3 часов. Раствор центрифугировали при  $10000 \times g$ , в течение 20 минут, при 4°C. Надосадочную жидкость насыщали сульфатом аммонием до концентрации 45% и инкубировали в течение 16 часов, после чего диализовали против PBS с pH 7,2.

#### Электрофорез в ПААГ-ДСН и иммуноблоттинг

Белки разделяли электрофорезом в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях с добавлением додецилсульфат натрия по методу [13]. Белки переносили на поливинилидендифторидовую мембрану методом полусухого переноса. Для предотвращения неспецифического связывания антител, мембрану блокировали в течение 16 часов 5% раствором обезжиренного сухого молока в Трис-буферном растворе с 0,1% Tween-20 (TBS-T). Мембрану инкубировали с поликлональными антителами анти-rM14 и анти-rM42 в разведении 1:15 000 в TBS-T в течение 1 часа на шейкере при комнатной температуре. Далее, мембрану трижды промывали TBS-T и инкубировали с антивидовыми антителами anti-Rabbit (Novex by life technologies, USA), конъюгированными с пероксидазой хрена в разведении 1:20 000 в течение 1 часа при комнатной температуре. После дополнительной промывки TBS-T, иммунореактивные полосы визуализировали с использованием набора для хемилюминесцентного детектирования.

#### Приготовление полного клеточного лизата штамма *B. paralicheniformis* T7

Культуру штамма *B. paralicheniformis* T7 растили в 5 мл бульона Луриа-Бертани при 37°C в течение 18 часов в шейкере-инкубаторе со встряхиванием 180 об/мин. Клетки собирали центрифугированием при  $10000 \times g$ , в течение 5 минут, при температуре +4°C. Клетки ресуспендировали в буфере 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl pH 7,5 и лизировали на ультразвуковом гомогенизаторе OmniRaptor 4000 (Kennesaw, USA). Лизат осветляли центрифугированием при  $13500 \times g$ , в течение 30 минут, 4°C. Осветленный лизат использовали в иммуноблоттинге.

#### Культивирование *B. paralicheniformis* T7 на кератин-содержащем сырье

Культуру штамма *B. paralicheniformis* T7 растили в 15 мл питательного бульона в шейкере-инкубаторе при 37°C и 170 об/мин, в течение 18 часов. 1 мл инокулюма добавляли в стеклянные пробирки с фрагментами рога, копыта, шкуры шерсти и пером в 10 мл натрий фосфатного буфера (pH 7,0). Инкубацию образцов проводили в шейкере-инкубаторе при 37°C, 250 об/мин в течение 7 суток. Надосадочную жидкость фильтровали и использовали в иммуноблоттинге.

#### Программное обеспечение, биоинформатический и статистический анализ

Измерение концентрации белка проводились в трех независимых повторениях и результат определяли, как среднее значение из трех повторений. Средние значения и стандартное отклонение (SD) рассчитывали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism V.8.0.1. Дизайн клонирования, расчет молекулярной массы и изо-

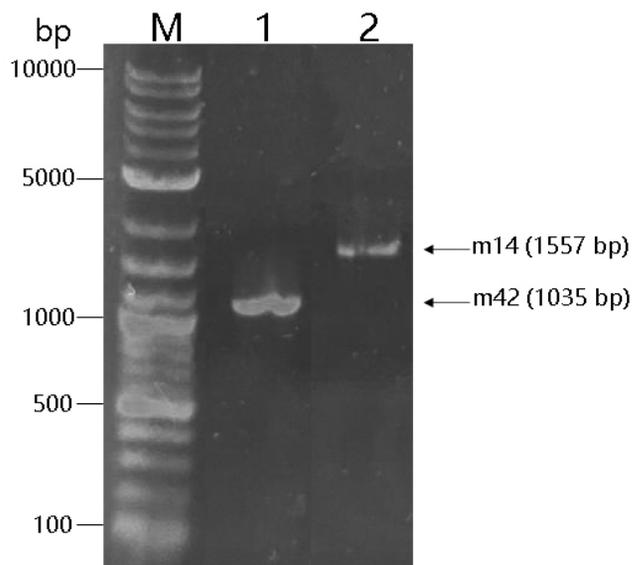
электрической точки проводили с помощью программы Clone Manager и SnapGene Viewer 5.2.4. Анализ хроматограмм после секвенирования проводили с помощью программы Vector NTI Advance 11. Определение секреторного пептида проводили с использованием онлайн доступного ресурса Peptide Signal IP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

#### Сборка генно-инженерных конструкций pET-28/M14 и pET-28/M42

На основе анализа полного генома штамма *B. paralicheniformis* T7 (GenBank accession # CP124861) были подобраны олигонуклеотиды, специфичные к генам металлопротеаз M14 и M42. Данные олигонуклеотиды содержали сайты для эндонуклеаз рестрикции BamHI и XhoI. С использованием указанных олигонуклеотидов были амплифицированы гены *m14* и *m42* (рисунок 1), которые были интегрированы в плазмидный вектор pET-28c(+).

ПЦР скрининг показал наличие вставки *m14* для клонов №13 и №16 и вставки *m42* для клона №2. Секвенирование подтвердило соответствие последовательности генам металлопротеаз из генома *B. paralicheniformis* T7 без каких-либо мутаций. В результате получены две генно-инженерные конструкции pET-28c/m14 и pET-28c/m42, в которых гены *m14* и *m42* встроены под контроль промотора РНК полимеразы бактериофага T7. В открытой рамке считывания белки M14 и M42 содержат гексагистидиновую метку с N-конца и насчитывают 528 и 353 аминокислотных остатка, соответственно. Расчетная масса ре-



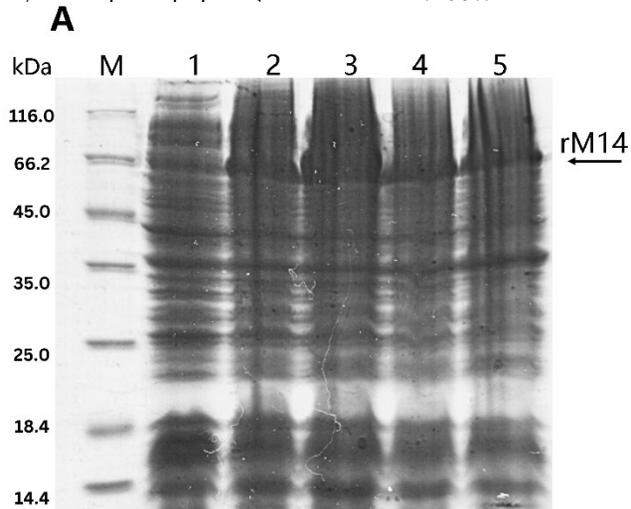
M – ДНК маркер (New England Biolabs, cat# N3200S); 1 – *m14*; 2 – *m42*

Рисунок 1. ПЦР-амплификация генов *m14* и *m42* из геномной ДНК *B. paralicheniformis*

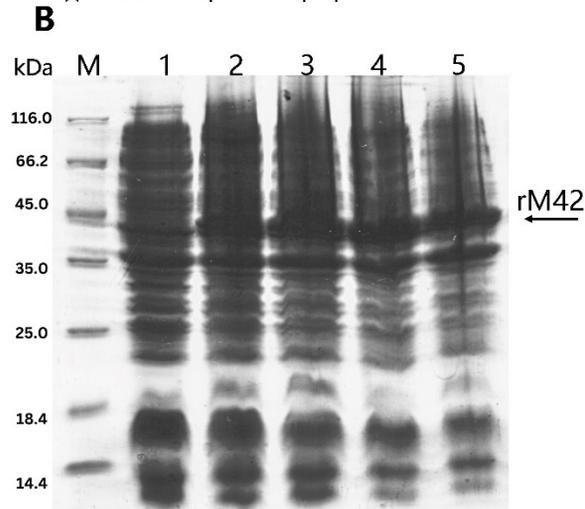
комбинантных белков составляет 60,6 кДа и 38,2 кДа для rM14 и rM42, соответственно.

Трансформация клеток *E. coli* и получение штаммов-продуцентов рекомбинантных металлопротеаз rM14 и rM42

Путем трансформации клеток *E. coli* штамма

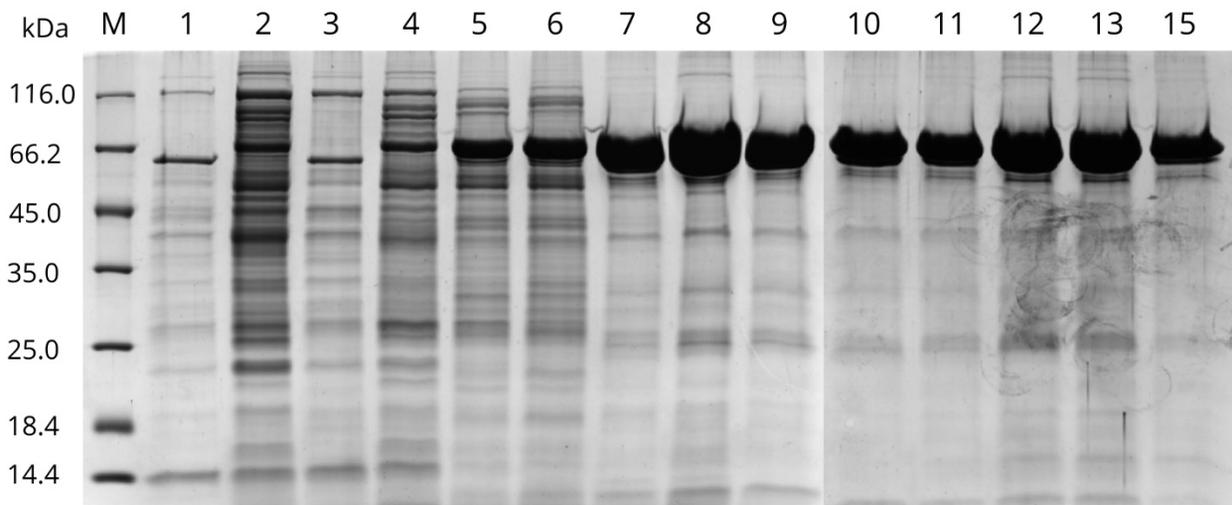


Выделение и хроматографическая очистка rM14 и



M - белковый маркер (Thermo Scientific cat#26610); 1-лизат до индукции; 2-индукция с ИПТГ 1 час; 3-индукция с ИПТГ 2 часа; 4-индукция с ИПТГ 4 часа; 5-индукция с ИПТГ 16 часов

Рисунок 2. Результаты ПААГ-ДСН электрофореза лизата после индукции *E. coli* ArcticExpressRP(DE3)/pET-28/m14 (A) и ArcticExpressRP(DE3)/pET-28/m42 (B)



M – белковый маркер (Thermo Scientific cat#26610); 1-4 – фракции, элюированные 20 мМ имидазолом; 5-6 – фракции, элюированные 70 мМ имидазолом; 7-10 – фракции, элюированные 100 мМ имидазолом; 11-15 – фракции, элюированные 150 мМ имидазолом.

Рисунок 3. Результаты хроматографической очистки рекомбинантного белка rM14 из индуцированной культуры ArcticExpressRP(DE3)/pET-28/m14

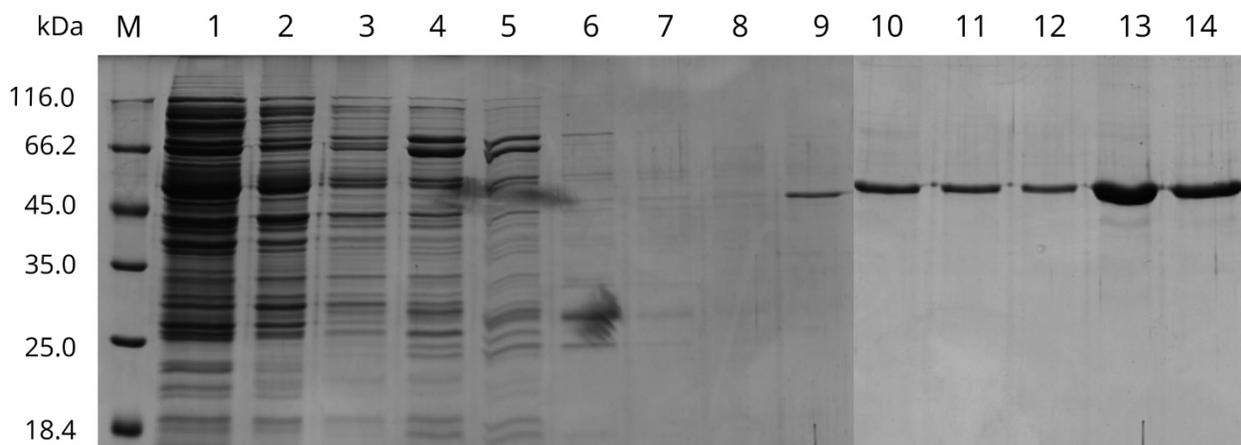
ArcticExpressRP(DE3) векторами с генами металлопротеаз получены рекомбинантные штаммы. На рисунке 2 показаны результаты ПААГ-ДСН электрофореза лизатов рекомбинантного штамма до и после индуцированной активации T7 промотора. Проверка экспрессии генов металлопротеаз показала, что рекомбинантные штаммы ArcticExpressRP(DE3)/pET-28c/m14 и ArcticExpressRP(DE3)/pET-28c/m42 при добавлении 0,5 мМ ИПТГ эффективно экспрессировали гены *m14* и *m42* на протяжении всего периода индукции. Из результатов следует, что в клетках штаммов наблюдается линейное накопление рекомбинантных белков rM14 и rM42.

На рисунке видно, что через 1 час после добавления ИПТГ в лизатах появляются дополнительные белки, соответствующие расчетным молекулярным массам белков rM14 и rM42.

rM42

Наличие гексагистидинового метки (6xHis-tag) позволяет быстро и эффективно проводить очистку рекомбинантных белков. Стратегия основана на аффинности имидазольного кольца остатков гистидина к ионам двухзарядным металлам. Проведенная металлоаффинная очистка с использованием Ni-NTA агарозы позволила получить чистые фракции белков rM14 и rM42 (рисунок 3 и 4). Из рисунка 3 следует, что элюция рекомбинантного белка rM14 начинается уже при концентрации имидазола 70 мМ. При концентрации имидазола 100 мМ и 150 мМ элюаты содержат минимальное количество примесных белков.

В отличие от rM14 белок rM42 обладает более высокой аффинностью к ионам никеля, что, по всей вероятности, связано с особенностью третичного строения дан-



М – белковый маркер (Thermo Scientific cat#26610); 1-3 – фракции, элюированные 70 мМ имидазолом; 4-5 – фракции, элюированные 100 мМ имидазолом; 6-8 – фракции, элюированные 150 мМ имидазолом; 9-11 – фракции, элюированные 250 мМ имидазолом; 12-14 – фракции, элюированные 500 мМ имидазолом.

Рисунок 4. Результаты хроматографической очистки рекомбинантного белка гM42 из индуцированной культуры ArcticExpressRP(DE3)/pET-28/m42

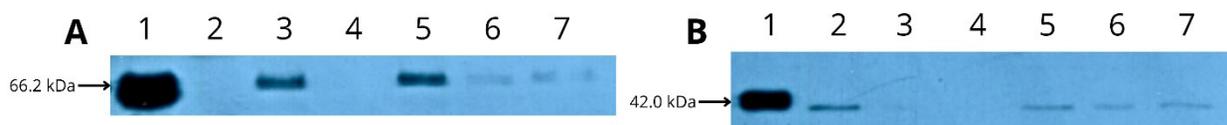
ного белка. При концентрации имидазола 70 мМ, 100 мМ и 150 мМ элюция белка гM42 не наблюдается (рисунок 4). Белок начинает элюировать только при достижении концентрации имидазола 250 мМ и продолжает элюировать с колонки при 500 мМ имидазола (рисунок 4). В результате хроматографической очистки получены рекомбинантные белки гM14 и гM42 в количестве  $13,83 \pm 0,29$  мг и 1,5 мг, что соответствует выходу 23 мг и 25 мг с 1 литра индуцированной культуры штаммов ArcticExpressRP(DE3)/pET-28c/m14 и ArcticExpressRP(DE3)/pET-28c/m42, соответственно.

Микробные протеазы востребованы в различных областях человеческой деятельности: пищевой, кормовой, перерабатывающей промышленности, производстве detergentов, фармацевтике. Стоимость микробных ферментов существенно ниже растительных и эукариотических аналогов, так как микроорганизмы продуцируют ферменты быстрее, чем клетки млекопитающих и растительные клетки, продукция ферментов не зависит от климатических условий и сезонных изменений и не нарушают этические и экологические нормы [2]. В зависимости от субстратной специфичности среди протеаз выделяют ферменты, способные к гидролизу прочных фибриллярных белков: коллагена и кератина [14, 15]. Известно, что кератиназы эффективно расщепляют как материалы с высоким содержанием кератина, например перья, ногти, шерсть, так и растворимые белковые субстраты, такие как казеин, сывороточные белки, БСА [16]. Перспективным источником дешевого белкового сырья представ-

ляются кератиновые отходы животноводства: перья, рога, копыта, шерсть, шкура. К примеру, куриные перья составляют около 5–7% от общего веса курицы [17, 18], а на шкуру, рога и копыта приходится 11% от веса КРС. Высокая протеолитическая активность кератиназ позволяет им гидролизовать очень устойчивые к внешнему воздействию кератины, из-за чего их рассматривают в качестве наиболее перспективных в промышленности протеолитических ферментов [19, 20].

Протеазы с кератиназной активностью представлены двумя субклассами протеиназ: сериновыми пептидазами и металлопротеазами [21]. С целью определения уровня экспрессии двух нативных металлопротеаз M14 и M42 в секреторной протеоме штамм *B. paralicheniformis* T7 культивировали в течение 7 суток на кератинсодержащем сырье: курином пере, образцах рога, копыта, шкуры и шерсти крупного рогатого скота. Дополнительно, анализу подвергали лизат штамма *B. paralicheniformis* T7. На рисунке 5 представлены результаты иммуноблоттинга указанных образцов с использованием поликлональных антител анти-гM14 и анти-гM42. В качестве положительного контроля использовали очищенные рекомбинантные белки гM14 и гM42.

Из представленных данных следует, что белок M14 отсутствует в клеточном лизате штамма *B. paralicheniformis* T7 и присутствует в секреторной протеоме, полученной путем культивирования на курином пере, копыте КРС. Незначительная экспрессия гена *m14* наблюдается в секреторных протеомах шерсти и шкуре КРС, но полно-



1-Рекомбинантный белок (гM14 для А и гM42 для В); 2-лизат *B. paralicheniformis* T7; 3-КЖ после культивирования на пере; 4-КЖ после культивирования на роге; 5-КЖ после культивирования на копыте; 6-КЖ после культивирования на шерсти; 7-КЖ после культивирования на шкуре

Рисунок 5. Результаты иммуноблоттинга культуральной жидкости и после культивирования штамма *B. paralicheniformis* T7 на кератинсодержащем сырье и лизата *B. paralicheniformis* T7 с использованием поликлональных антител анти-гM14 (А) и анти-гM42 (В)

стью отсутствует в образце с рогом КРС. Белок M42 в отличие от M14 присутствует в лизате *B. paralicheniformis* T7 и также присутствует в протеомах с копытом, шкурой и шерстью. Экспрессия гена *m42* не наблюдается в образцах с куриным пером и рогом КРС. Отсутствие белка M14 в лизате *B. paralicheniformis* T7 можно объяснить тем, что у металлопротеазы M14 в отличие от M42 в составе белка с N-конца имеется пептид MNIQKRVQALLAAAAMFAGLMVSDAVHA, который, как показал анализ, обеспечивает внеклеточную секрецию белка. При секреции белка M14 происходит удаление секреторного пептида, что ведет к уменьшению молекулярной массы белка на 3 кДа. Данное обстоятельство объясняет наблюдаемое различие в массе белка M14. Анализ последовательности M42 показал отсутствие какого-либо секреторного пептида. Незначительное присутствие M42 в секреторных протеомах с копытом, шкурой и шерстью можно объяснить частичным лизисом клеток *B. paralicheniformis* T7, которое возникает в процессе культивирования. Из результатов следует, что куриное перо и копыто КРС являются эффективными стимуляторами для экспрессии гена *m14*. Данные белковые субстраты в отличие от шкуры и шерсти КРС в большей степени подходят для задачи получения металлопротеазы M14. Культивирование на роге КРС не ведет к какой-либо экспрессии M14 или M42.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании успешно клонированы, экспрессированы в клетках *E. coli* и очищены две рекомбинантные металлопротеазы M14 и M42 из штамма *Bacillus paralicheniformis* T7. Выход рекомбинантных белков составил 23 мг и 2,5 мг с 1 литра индуцированной культуры для rM14 и rM42, соответственно. Путем иммунизации кроликов получены поликлональные антитела анти-rM14 и анти-rM42, которые показали высокую специфичность и чувствительность к металлопротеазам M14 и M42, соответственно. Путем культивирования штамма *B. paralicheniformis* T7 на кератинсодержащих отходах: курином пере, образцов рога, копыта, шкуры и шерсти крупного рогатого скота получены секреторные протеомы, которые наряду с полным лизатом *B. paralicheniformis* T7 были исследованы методом иммуноблоттинга на предмет содержания нативных металлопротеаз M14 и M42. Было установлено, что наблюдается зависимость уровня экспрессии генов металлопротеаз *m14* и *m42* в зависимости от субстрата. Наилучшим субстратом для получения протеазы M14 являются куриное перо и копыто КРС. Протеазу M42 можно получать путем культивирования штамма на средах, содержащих копыто, шкуру или шерсть. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности получения металлопротеаз M14 и M42 путем культивирования штамма *B. paralicheniformis* T7 на кератинсодержащих отходах.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данное исследование было профинансировано Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (Грант AP14869708).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

От имени всех авторов, отвечающий автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S., Deshpande V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases // Microbiology and molecular biology reviews : MMBR. – 1998. – Vol. 62, №. 3. – P. 597-635. 10.1128/MMBR.62.3.597-635.1998.
2. Contesini F. J., Melo R. R., Sato H. H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application // Crit Rev Biotechnol. – 2018. – Vol. 38, №. 3. – P. 321-334. 10.1080/07388551.2017.1354354.
3. Jagadeesan Y., Meenakshisundaram S., Saravanan V., Balaiah A. Sustainable production, biochemical and molecular characterization of thermo-and-solvent stable alkaline serine keratinase from novel *Bacillus pumilus* AR57 for promising poultry solid waste management // Int J Biol Macromol. – 2020. – Vol. 163. – P. 135-146. 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.219.
4. Ward O. P. 3.49 - Proteases // Comprehensive Biotechnology (Third Edition) / Moo-Young M. – Oxford: Pergamon, 2011. – P. 604-615.
5. Abdelgalil S. A., Soliman N. A., Abo-Zaid G. A., Abdel-Fattah Y. R. Dynamic consolidated bioprocessing for innovative lab-scale production of bacterial alkaline phosphatase from *Bacillus paralicheniformis* strain APSO // Sci Rep. – 2021. – Vol. 11, №. 1. – P. 6071. 10.1038/s41598-021-85207-4.
6. SanthaKalaikumari S., Sivakumar R., Gunasekaran P., Rajendhran J. Whole-genome Sequencing and Mining of Protease Coding Genes in *Bacillus paralicheniformis* MKU3, and its Degradomics in Feather Meal Medium // Curr Microbiol. – 2021. – Vol. 78, №. 1. – P. 206-217. 10.1007/s00284-020-02271-1.
7. Fang Z., Yong Y. C., Zhang J., Du G., Chen J. Keratinolytic protease: a green biocatalyst for leather industry // Appl Microbiol Biotechnol. – 2017. – Vol. 101, №. 21. – P. 7771-7779. 10.1007/s00253-017-8484-1.
8. Papadopoulou M. C. The effect of enzymatic treatment on amino acid content and nitrogen characteristics of feather meal // Animal Feed Science and Technology. – 1986. – Vol. 16, №. 1. – P. 151-156. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(86\)90058-1](https://doi.org/10.1016/0377-8401(86)90058-1).
9. Rehman R., Ahmed M., Siddique A., Hasan F., Hameed A., Jamal A. Catalytic Role of Thermostable Metalloproteases from *Bacillus subtilis* KT004404 as Dehairing and Destaining Agent // Appl Biochem Biotechnol. – 2017. – Vol. 181, №. 1. – P. 434-450. 10.1007/s12010-016-2222-5.
10. Cai C. G., Lou B. G., Zheng X. D. Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis* // J Zhejiang Univ Sci B. – 2008. – Vol. 9, №. 1. – P. 60-7. 10.1631/jzus.B061620.
11. Kornilowicz-Kowalska T., Bohacz J. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects // Waste Manag. – 2011. – Vol. 31, №. 8. – P. 1689-701.

10.1016/j.wasman.2011.03.024.

12. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248-54.

13. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Vol. 227, №. 5259. – P. 680-5.

14. Daroit D. J., Brandelli A. A current assessment on the production of bacterial keratinases // *Crit Rev Biotechnol.* – 2014. – Vol. 34, №. 4. – P. 372-84. 10.3109/07388551.2013.794768.

15. Wang B., Yang W., McKittrick J., Meyers M. A. Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration // *Progress in Materials Science.* – 2016. – Vol. 76. – P. 229-318. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.06.001>.

16. Brandelli A., Daroit D. J., Riffel A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2010. – Vol. 85, №. 6. – P. 1735-50. 10.1007/s00253-009-2398-5.

17. Babalola M. O., Ayodeji A. O., Bamidele O. S., Ajele J. O. Biochemical characterization of a surfactant-stable keratinase purified from *Proteus vulgaris* EMB-14 grown on low-cost feather meal // *Biotechnology Letters.* – 2020. – Vol. 42, №. 12. – P. 2673-2683. 10.1007/s10529-020-02976-0.

18. Fraser R. D., Parry D. A. Molecular packing in the feather keratin filament // *J Struct Biol.* – 2008. – Vol. 162, №. 1. – P. 1-13. 10.1016/j.jsb.2008.01.011.

19. Gupta R., Sharma R., Beg Q. K. Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology // *Crit Rev Biotechnol.* – 2013. – Vol. 33, №. 2. – P. 216-28. 10.3109/07388551.2012.685051.

20. Gupta R., Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2006. – Vol. 70, №. 1. – P. 21-33. 10.1007/s00253-005-0239-8.

21. Ramnani P., Singh R., Gupta R. Keratinolytic potential of *Bacillus licheniformis* RG1: Structural and biochemical mechanism of feather degradation // *Canadian journal of microbiology.* – 2005. – Vol. 51. – P. 191-6. 10.1139/w04-123.

## REFERENCES

1. Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S., Deshpande V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases // *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR. – 1998. – Vol. 62, №. 3. – P. 597-635. 10.1128/MMBR.62.3.597-635.1998.

2. Contesini F. J., Melo R. R., Sato H. H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application // *Crit Rev Biotechnol.* – 2018. – Vol. 38, №. 3. – P. 321-334. 10.1080/07388551.2017.1354354.

3. Jagadeesan Y., Meenakshisundaram S., Saravanan V., Balaiah A. Sustainable production, biochemical and molecular characterization of thermo-and-solvent stable alkaline serine keratinase from novel *Bacillus pumilus* AR57 for promising poultry solid waste management // *Int J Biol Macromol.* – 2020. – Vol. 163. – P. 135-146. 10.1016/j.

ijbiomac.2020.06.219.

4. Ward O. P. 3.49 - Proteases // *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)* / Moo-Young M. – Oxford: Pergamon, 2011. – C. 604-615.

5. Abdelgalil S. A., Soliman N. A., Abo-Zaid G. A., Abdel-Fattah Y. R. Dynamic consolidated bioprocessing for innovative lab-scale production of bacterial alkaline phosphatase from *Bacillus paralicheniformis* strain APSO // *Sci Rep.* – 2021. – Vol. 11, №. 1. – P. 6071. 10.1038/s41598-021-85207-4.

6. SanthaKalaikumari S., Sivakumar R., Gunasekaran P., Rajendhran J. Whole-genome Sequencing and Mining of Protease Coding Genes in *Bacillus paralicheniformis* MKU3, and its Degradomics in Feather Meal Medium // *Curr Microbiol.* – 2021. – Vol. 78, №. 1. – P. 206-217. 10.1007/s00284-020-02271-1.

7. Fang Z., Yong Y. C., Zhang J., Du G., Chen J. Keratinolytic protease: a green biocatalyst for leather industry // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2017. – Vol. 101, №. 21. – P. 7771-7779. 10.1007/s00253-017-8484-1.

8. Papadopoulos M. C. The effect of enzymatic treatment on amino acid content and nitrogen characteristics of feather meal // *Animal Feed Science and Technology.* – 1986. – Vol. 16, №. 1. – P. 151-156. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(86\)90058-1](https://doi.org/10.1016/0377-8401(86)90058-1).

9. Rehman R., Ahmed M., Siddique A., Hasan F., Hameed A., Jamal A. Catalytic Role of Thermostable Metalloproteases from *Bacillus subtilis* KT004404 as Dehairing and Destaining Agent // *Appl Biochem Biotechnol.* – 2017. – Vol. 181, №. 1. – P. 434-450. 10.1007/s12010-016-2222-5.

10. Cai C. G., Lou B. G., Zheng X. D. Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis* // *J Zhejiang Univ Sci B.* – 2008. – Vol. 9, №. 1. – P. 60-7. 10.1631/jzus.B061620.

11. Kornilłowicz-Kowalska T., Bohacz J. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects // *Waste Manag.* – 2011. – Vol. 31, №. 8. – P. 1689-701. 10.1016/j.wasman.2011.03.024.

12. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248-54.

13. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Vol. 227, №. 5259. – P. 680-5.

14. Daroit D. J., Brandelli A. A current assessment on the production of bacterial keratinases // *Crit Rev Biotechnol.* – 2014. – Vol. 34, №. 4. – P. 372-84. 10.3109/07388551.2013.794768.

15. Wang B., Yang W., McKittrick J., Meyers M. A. Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration // *Progress in Materials Science.* – 2016. – Vol. 76. – P. 229-318. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.06.001>.

16. Brandelli A., Daroit D. J., Riffel A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2010. – Vol. 85, №. 6. – P. 1735-50. 10.1007/s00253-009-2398-5.

17. Babalola M. O., Ayodeji A. O., Bamidele O. S., Ajele J. O. Biochemical characterization of a surfactant-stable keratinase purified from *Proteus vulgaris* EMB-14 grown on low-cost feather meal // *Biotechnology Letters*. – 2020. – Vol. 42, №. 12. – P. 2673-2683. 10.1007/s10529-020-02976-0.
18. Fraser R. D., Parry D. A. Molecular packing in the feather keratin filament // *J Struct Biol*. – 2008. – Vol. 162, №. 1. – P. 1-13. 10.1016/j.jsb.2008.01.011.
19. Gupta R., Sharma R., Beg Q. K. Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology // *Crit Rev Biotechnol*. – 2013. – Vol. 33, №. 2. – P. 216-28. 10.3109/07388551.2012.685051.
20. Gupta R., Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2006. – Vol. 70, №. 1. – P. 21-33. 10.1007/s00253-005-0239-8.
21. Ramnani P., Singh R., Gupta R. Keratinolytic potential of *Bacillus licheniformis* RG1: Structural and biochemical mechanism of feather degradation // *Canadian journal of microbiology*. – 2005. – Vol. 51. – P. 191-6. 10.1139/w04-123.

ӘОЖ 577.21; 577.27

**ANTI-RM14 ЖӘНЕ ANTI-RM42 АНТИДЕНЕЛЕРІН ДАЙЫНДАУ ЖӘНЕ ОЛАРДЫ  
BACILLUS PARALICHENIFORMIS КЕРАТИНОЛИТИКАЛЫҚ ШТАММЫНЫҢ М14 ЖӘНЕ М42  
МЕТАЛЛОПРОТЕАЗАЛАРЫНЫҢ ЭКСПРЕССИЯСЫН ЗЕРТТЕУДЕ ҚОЛДАНУ**Мадухасова А.К.<sup>1,2</sup>, Мусахметов А.С.<sup>1</sup>, Акишев Ж.Д.<sup>1</sup>, Актаева С.А.<sup>1,2</sup>, Хасенов Б.Б.<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Ұлттық биотехнология орталығы, Қорғалжын тас жолы, 13/5, Астана қ., 010000;<sup>2</sup>Л.Н.Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Сәтпаев, 2, Астана, 010008.

\*khassenov@biocenter.kz

**АБСТРАКТ**

Берілген зерттеуде жоғары протеоликалық белсенділігі бар, *Bacillus paralicheniformis* T7 казахстандық штаммынан екі металлопротеаза, М14 және М42, клондалды, экспрессияланды және тазартылады. Протеаза гендері *B. paralicheniformis* штаммының T7 (GenBank #CP124861) толық геномды секвенирлеу деректері негізінде таңдалған арнайы праймерлер арқылы полимеразды тіцбекті реакция (ПТР) арқылы амплификацияланды. Амплификацияланған фрагменттер рЕТ-28с(+) экспрессиялық векторына клондалып, М14 және М42 металлопротеазаларының рекомбинантты аналогтары *Escherichia coli* Arctic ExpressRP(DE3) штаммындағы плазмидті экспрессиясы арқылы алынды. rM14 және rM42 ақуыздары метал аффинді хроматографиясы арқылы тазартылып, зертханалық қояндарды иммундау арқылы поликлоналды антиденелер алынды. Anti-rM14 және anti-rM42 антиденелерін пайдалана отырып, М14 және М42 нативті металлопротеазаларының экспрессия деңгейі *B. paralicheniformis* T7 штаммының жасуша лизатында және дақылдық сұйықтығында зерттелді. Штаммды кератинді қоректік орталарда өсіргеннен кейін: тауық қауырсыны, ірі қара малдың мүйізі, тұяғы, терісінде және жүнінде *B. paralicheniformis* T7 штаммы М14 және М42 металлопротеазаларының продуценті ретінде пайдалану мүмкіндігін айқындады.

Негізгі сөздер: протеазалар, антиденелер, *Bacillus paralicheniformis*, рекомбинантты ақуыз, металлопротеазалар, М14, М42.

UDC 577.21; 577.27

**PRODUCTION OF ANTI-RM14 AND ANTI-RM42 ANTIBODIES AND THEIR APPLICATION IN THE  
STUDY OF EXPRESSION OF METALLOPROTEASES M14 AND M42 OF KERATINOLYTIC STRAIN OF  
BACILLUS PARALICHENIFORMIS**Maduakhassova A.<sup>1,2</sup>, Mussakhmetov A.<sup>1</sup>, Akishev Zh.<sup>1</sup>, Aktayeva S.<sup>1,2</sup>, Khassenov B.<sup>1\*</sup><sup>1</sup>National Center for Biotechnology, 13/5 Korgalzhyn Road, Astana, 010000;<sup>2</sup>L.N.Gumilyev Eurasian National University, 2 Kanysh Satpayev Street, Astana, 010008;

\*khassenov@biocenter.kz

**ABSTRACT**

In the present study, two metalloproteases M14 and M42 from a Kazakh strain of *Bacillus paralicheniformis* T7 with high proteolytic activity were successfully cloned, expressed and purified. Protease genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers selected on the basis of full genome sequencing data of *B. paralicheniformis* strain N7 (GenBank accession #CP124861). The amplified fragments were cloned in the expression vector pET-28c(+). Recombinant analogs of the metalloproteases M14 and M42 were obtained by plasmid expression in *Escherichia coli* cells of the strain ArcticExpressRP(DE3). Using metal affinity chromatography, rM14 and rM42 proteins were purified and polyclonal antibodies were produced by immunization of rabbits. Using anti-rM14 and anti-rM42 antibodies, the expression level of native metalloproteases M14 and M42 in cell lysate and culture fluid of *B. paralicheniformis* T7 strain was examined after culturing the strain on keratin-containing media: chicken feather, horn, hoof, hide and wool of cattle. Substrate-dependent expression of metalloprotease genes of *B. paralicheniformis* strain T7 was established. The obtained results indicate the prospective use *B. paralicheniformis* strain T7 as a producer of metalloproteases M14 and M42.

**Keywords:** proteases, antibodies, *Bacillus paralicheniformis*, recombinant protein, metalloproteases, M14, M42.