

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЛИКОЗИДАЗ КАК ЭТАП СОЗДАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ИНСТРУМЕНТОВ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ МОДИФИКАЦИИ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ

О.М. Конева, М.И. Потапович, В.А. Прокулевич

Национальный центр биотехнологии

Республика Казахстан, 000010, г. Астана, Кургальжинское шоссе 13/5

e-mail: volga.koneva@gmail.com

Антигены групп крови человека представляют собой олигосахаридные или белковые молекулы, располагающиеся на поверхности эритроцитов, эндотелия и большинства эпителиальных клеток. В практике трансфузиологии рутинным является тестирование на совместимость антигенов по системам АВО и RHD, которые являются важными для обеспечения безопасности пациента при переливании крови. На основе гликопротеиновых антигенов согласно системе АВО группы крови разделяют на 4 типа: А, В, АВ, и О, в зависимости от типа присутствующего антигена.

Антигены А, В и Н представляют собой углеводные структуры. Олигосахариды синтезируются поэтапно, причем присоединение каждого моносахарида катализируется специфической гликозилтрансферазой. Структурным различием между антигенами групп крови является наличие или отсутствие терминального остатка моносахарида, связанного с предшественником общей цепи в антигенах А, В и Н соответственно. Бактериальные гликозидазы могут быть использованы при трансплантации органов для ферментативного отщепления – N-ацетилгалактозамина в случае антигена А и α -галактозы в случае антигена В, что приведет к превращению этих антигенов в универсальный непреобразованный Н-антиген и, как следствие, к снижению вероятности острого отторжения трансплантата.

В задачу представленного исследования входило получение штаммов-продуцентов бактериальных рекомбинантных гликозидаз.

Аминокислотные последовательности α -D-галактозамин галактозидазы и N-ацетил- α -D-галактозамин деацетилазы

Flavonifractor plautii взяты из базы данных UniProt – коды доступа P0DTR5 и P0DTR4 соответственно. Для оптимизации экспрессии генов в клетках *E. coli* путем обратной трансляции определяли нуклеотидные последовательности с заменой редких синонимических кодонов.

Последовательности генов бактериальных гликозидаз, синтезированные в виде двухцепочечных фрагментов ДНК (gBlocks), амплифицировали с использованием праймеров, несущих сайты узнавания для рестриктаз. После рестрикции ампликонов и вектора pET-24b(+) в ходе реакции лигирования получены гибридные конструкции, которыми трансформировали компетентные клетки *E. coli* XL-1 Blue. Наличие вставки в рекомбинантных плазидах, выделенных из положительных клонов, подтверждено с помощью ПЦР и рестрикционного анализа. Бактерии штамма *E. coli* XJa(DE3) трансформировали сконструированными плазидами для экспрессии α -D-галактозамин галактозидазы и N-ацетил- α -D-галактозамин деацетилазы обозначенными pET-24b- α Gal и pET-24b-NADA соответственно.

Индукцию экспрессии проводили при 37°C в присутствии ИПТГ в конечной концентрации 0,5 мМ в течение 4 часов. Образцы клеточных лизатов индуцированных и неиндуцированных культур клеток затем анализировали в ходе ДСН-ПААГ электрофореза, по результатам которого показано накопление дополнительных белков в индуцированных клетках бактерий, соответствующих по молекулярной массе α -D-галактозамин галактозидазе (около 116 кДа) и N-ацетил- α -D-галактозамин деацетилазе (около 82 кДа) и обладающих гликозидазной активностью.