

ПОЛУЧЕНИЕ В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* РЕКОМБИНАНТНОГО ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО БЕЛКА P62

Н.В. Сауткина, И.Д. Матчан, О.В. Пластинина, В.А. Прокулевич

Белорусский государственный университет, Республика Беларусь, 220030, Минск, пр. Независимости, 4
sovgirnv@gmail.com

Протеостаз включает внутриклеточные биологические пути, контролирующие биогенез, фолдинг, перенос и деградацию белков, присутствующих внутри и вне клетки. Эффективный протеостаз имеет решающее значение для поддержания соматического гомеостаза, а его снижение во время старения приводит к клеточной дисфункции и заболеваниям. Селективная аутофагия представляет собой форму аутофагии, опосредованную рецепторами, которые нацелены на специфические субстраты для деградации, и является важным процессом для поддержания протеостаза.

Белок секвестосома-1 (p62/SQSTM1) известен как убиквитин-связывающий белок p62 с доменной организацией. Он является классическим селективным рецептором аутофагии, но также выполняет определенные функции в убиквитин-протеасомной системе, клеточном метаболизме, передаче сигналов и апоптозе. Белок p62 играет решающую роль во множестве клеточных процессов, включая реакцию на повреждение ДНК, старение, инфекцию и иммунитет, хроническое воспаление и канцерогенез, зависящий от аутофагии или независимый от нее. Потеря p62 приводит к ускоренному старению клеток из-за снижения протеостаза, нарушения регуляции сигнальных путей и способности реагировать на окислительный стресс.

Целью работы является клонирование и экспрессия рекомбинантного человеческого белка p62 в клетках бактерий *E. coli*.

В процессе разработки дизайна гена, обозначенного как *p62*, определяли нуклеотидную по-

следовательность путем обратной трансляции соответствующей первичной структуры белка p62 из базы данных UniProt, затем оптимизировали для усиления экспрессии в клетках бактерий *E. coli* до значения CAI=0,8. На 5'-конце фрагмента вводили сайт узнавания эндонуклеазы NdeI, на 3'-конце – сайт узнавания эндонуклеазы EcoRI и стоп-кодона.

Ген *p62* по соответствующим сайтам рестрикции вводили в состав вектора pET-24b(+) (Novagen) под контролем промотора бактериофага T7 и клонировали в клетках штамма *E. coli* XL1-Blue. Результаты клонирования проверяли ПЦР-анализом трансформантов с использованием праймеров, фланкирующих полилинкерную область вектора, а также рестрикционным анализом рекомбинантных плазмид.

Индукцировали экспрессию гена *p62* в клетках штамма *E. coli* BL21-Gold(DE3) синтетическим аналогом лактозы – ИПТГ (0,5 ммоль/л) при 37 °C в течение 4 часов. Эффективность экспрессии анализировали при помощи SDS-PAGE электрофореза, результаты которого показали, что целевой белок массой около 48 кДа накапливается в бактериальных клетках.

Таким образом, получен бактериальный продукт, в клетках которого рекомбинантный многофункциональный человеческий белок p62 синтезируется в количестве около 25 % от общего клеточного белка при стандартных условиях индукции экспрессии, рекомендованных производителями плазмид серии pET.