

## ИЗУЧЕНИЕ МЕТАЛЛОПРОТЕАЗ M14 И M42 ШТАММА *BACILLUS PARALICHENIFORMIS*

А.К. Мадухасова<sup>1,2</sup>, А.С. Мусахметов<sup>2</sup>, Б.Б. Хасенов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Национальный центр биотехнологии, Республика Казахстан, 010000, г. Астана, Кургальжинское шоссе 13/5

<sup>2</sup> Евразийский национальный университет имени Л. Н. Гумилева, Республика Казахстан, 010000, Астана, ул. Сатпаева 2

e-mail: [maduahasova@biocenter.kz](mailto:maduahasova@biocenter.kz)

Протеазы являются ферментами, гидролизующими белки по пептидным связям, и классифицируются на семейства сериновых, цистеиновых, аспартатных и металлопротеаз. Протеазы, в особенности, микробного происхождения используются в различных отраслях человеческой деятельности. Штаммы-продуценты бациллярных протеаз способны расти на недорогих питательных средах, что имеет немаловажное значение для индустрии. Целью работы являлось получение рекомбинантных металлопротеаз M14 и M42 бациллярного происхождения и изучение их свойств.

На основании последовательности генома штамма *Bacillus paralicheniformis* (GenBank NCBI под номером доступа CP124861) подобраны праймеры для клонирования генов металлопротеаз M14 и M42 с молекулярными массами 60,6 кДа и 38,2 кДа, соответственно. Гены были клонированы в составе бактериального экспрессионного вектора рЕТ-28с(+) по сайтам BamHI и XhoI и встроены под контроль промотора T7. Биоинформатический анализ показал, что металлопротеаза M14 содержит сигнальный пептид MNIQKRVQALLAAAAMFAGLMVSDAVHA, который был удален при клонировании.

Путем плазмидной экспрессии в штамме *Escherichia coli* ArcticExpress(DE3)RP получены рекомбинантные белки rM14 и rM42. Индукцию для гетерологичной экспрессии осуществляли путем добавления 0,5 мМ изопропил-β-тио-галактопиранозид. Очистку rM14 и rM42 из бактериального лизата осуществляли методом металлоаффинной хроматографии с использованием Ni-NTA сорбента. Очищенный рекомбинантный белки были диализованы на мембране с

порогом отсечения 14 кДа. Выход рекомбинантных белков rM14 и rM42 составил 27,5 мг и 1,67 мг с 1 литра индуцированной культуры, соответственно.

Изучение биохимических свойств показало, что металлопротеазы rM14 и rM42 активны при 50°C в буфере Tris-HCl с рН 7,0. Зимографический анализ на казеине, сополимеризованным с полиакриламидным гелем подтвердил протеолитическую активность rM14 и rM42.

Полученными рекомбинантными белками были иммунизированы кролики. Иммунизацию проводили в течение 1 месяца. После подтверждения иммунного ответа, была получена сыворотка, из которой были выделены антитела анти-rM14 и анти-rM42 путем высаливания сульфатом аммония с последующим диализом. С помощью данных антител методом вестерн-блоттинга была проверена секреция металлопротеаз M14 и M42 в энзиматическом экстракте, полученном путем культивирования нативного штамма *Bacillus paralicheniformis* на перьевой среде. Установлено, что в энзиматическом экстракте штамма *Bacillus paralicheniformis* присутствует металлопротеаза M14 и отсутствует M42, что можно объяснить определяющей ролью сигнального пептида.

В дальнейшем будет продолжено изучение металлопротеаз rM14 и rM42, а полученные антитела rM14 и анти-rM42 будут использованы для определения уровня накопления нативных металлопротеаз в секреторной и внутриклеточной протеоме протеолитических штаммов рода *Bacillus* при их культивировании на различных субстратах.