

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»**

УДК 679.66:615.371:579.842.11:579.66:577.217.3

**Казловский
Илья Сергеевич**

**РЕКОНСТРУКЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БЕСКЛЕТОЧНОЙ
СИСТЕМЫ ТРАНСЛЯЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ
ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫХ БЕЛКОВ**

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

по специальности **03.01.06** – биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

Минск 2021

Научная работа выполнена в государственном научном учреждении «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»

Научный руководитель: **Зинченко Анатолий Иванович**, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси, заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии государственного научного учреждения «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»

Официальные оппоненты: **Ермишин Александр Петрович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генетики картофеля государственного научного учреждения «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»


Курченко Владимир Петрович, кандидат биологических наук, доцент, заведующий лабораторией прикладных проблем биологии биологического факультета Белорусского государственного университета

Оппонирующая организация: Учреждение образования «Белорусский государственный технологический университет»

Защита состоится «21» декабря 2021 года в 12.00 ч на заседании совета по защите диссертаций Д 01.34.01 при государственном научном учреждении «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 220141, г. Минск, ул. акад. В.Ф. Купревича, 2, тел.: +375-17-357-89-24, тел./факс: +375-17-395-47-66; e-mail: microbio@mbio.bas-net.by

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке государственного научного учреждения «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси».

Автореферат разослан «19» ноября 2021 г.

Ученый секретарь совета по защите диссертаций, кандидат биологических наук  Семашко Т.В.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в мире успешно осваивается методический прием получения препаратов протеиновой природы (ферментов, интерферонов, антигенов, антител, гормонов) с использованием генно-инженерного инструментария (выделение и клонирование генов, введение генов в клетки микроорганизмов-реципиентов и наработка конечного продукта в трансформированных клетках) (Dondapati et al., 2020).

Однако, несмотря на большие успехи в области генной инженерии, данный подход имеет существенные ограничения. Поэтому ряд ученых в последнее время в качестве альтернативы традиционным генно-инженерным методам использует систему бесклеточной трансляции или, другое название, систему бесклеточного синтеза белка (БСБ), при этом особенно популярны системы, основанные на лизатах бактериальных, дрожжевых и растительных клеток (Dondapati et al., 2020).

Система БСБ предусматривает транскрипцию гена и трансляцию мРНК *in vitro* в лизате клеток, в который вносят рекомбинантную ДНК, аминокислоты, нуклеотиды, кофакторы и АТФ-регенерирующую систему.

По сравнению с *in vivo* системами, основанными на цельноклеточном синтезе, системы БСБ обладают следующими преимуществами, такими как:

- синтез исключительно целевого белка;
- возможность продуцирования белков, токсичных для клеток;
- получение белков, которые содержат радиоактивно-меченые или неприродные аминокислоты;
- и, самое главное, – появляется возможность решать проблему агрегации целевого белка путем ввода в реакционную смесь агентов, позволяющих удерживать синтезирующийся полипептид в растворе.

Несмотря на все более широкое использование данного подхода и его перспективность, у него есть несколько недостатков, среди которых: труднодоступность компонентов реакционной смеси (нуклеозид-5-трифосфатов (НТФ), РНК-синтаз и т.д.); сложность приготовления клеточных лизатов, предусматривающее использование дорогостоящего оборудования; отсутствие универсальной системы экспрессии для синтеза белков различной природы, особенно эукариотического происхождения.

В связи с вышеизложенным реконструкция системы БСБ, основанная на легкодоступном лизате клеток *Escherichia coli*, является актуальной задачей, которая несмотря на свои недостатки с соответствующей оптимизацией может позволить синтезировать ряд хозяйственно ценных белков, получение которых традиционным способом, предусматривающим использование целых бактериальных клеток, затруднено.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами. Работа выполнена в рамках проектов, входящих в состав двух программ:

– проект 3.13 «Разработка бактериальной системы бесклеточного синтеза белка для получения ряда хозяйственно ценных белковых продуктов» подпрограмма «Микробные биотехнологии» ГПНИ «Биотехнологии» на 2016-2020 годы (№ госрегистрации 20160080);

– договор №1/110.5-2019 от 27 декабря 2019 г. по теме «Создать штамм-продуцент рекомбинантной субъединицы в термолабильного токсина *E. coli* для последующего использования в специфической профилактике желудочно-кишечных бактериальных инфекций крупно-рогатого скота (КРС)» (№ госрегистрации 20200216), выполненный в рамках мероприятия 110⁵ «Разработать технологию изготовления вакцины для специфической профилактики бактериальных энтеритов крупного рогатого скота с термолабильным анатоксином *E. coli*» подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии-2020» ГП «Научное обеспечение технологий и техника» на 2016-2020 годы.

Тема диссертационного исследования соответствует приоритетным направлениям научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 годы, утверждённым указом Президента Республики Беларусь от 7 мая 2021 г. № 156: п. 2 «Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства: биотехнологии (геномные и постгеномные, клеточные, микробные, медицинские, промышленные)».

Цель и задачи исследования. Цель работы – реконструировать бактериальную бесклеточную систему трансляции и экспериментально обосновать ее эффективное использование для получения ряда хозяйственно ценных белков.

В соответствии с целью поставлены следующие задачи:

– реконструировать и оптимизировать параметры функционирования системы БСБ на основе лизата клеток *E. coli*;

– сконструировать штамм, продуцирующий рекомбинатную ДНК-зависимую РНК-полимеразу бактериофага T7 (T7-РНК-полимеразу), необходимую для функционирования системы БСБ;

– создать штаммы-продуценты нуклеозидмонофосфаткиназ и использовать их для получения НТФ;

– модифицировать экспрессионную рЕТ-систему для повышения эффективности ее использования в системе БСБ;

– провести сравнительный анализ использования бесклеточной и цельноклеточной системы для синтеза хозяйственно ценных белков, таких как:

- аденозиндезаминаза *E. coli*;

- дигуанилатциклаза *Thermotoga maritima*;
- химерный белок, состоящий из *Taq*-ДНК-полимеразы и ДНК-связывающего домена бактерии *Sulfolobus solfataricus* (диамант-ДНК-полимераза);
- белок интенсивно сладкого вкуса – браззеин;
- субъединица «В» термолабильного токсина *E. coli* (далее – субъединица бактериального токсина);

– создать лабораторную технологию получения набора реагентов для синтеза различных белковых продуктов в системе БСБ;

– создать лабораторные технологии получения субъединицы бактериального токсина с использованием цельноклеточной и бесклеточной систем.

Научная новизна. Впервые путем введения точечной мутации в сайт репликации *ori* и одновременного удаления гена *rop* в векторе pET42a(+) получена новая плазмида, названная pEt42mut. Созданная плазмида характеризуется по сравнению с родительской на порядок повышенной копийностью. Использование такой плазмиды позволяет упростить способ ее выделения из клеток-хозяев и соответственно снизить затраты на ее получение.

Получен химерный белок, состоящий из ДНК-аффинного домена *S. solfataricus* (*Sso7d*) и ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактериофага Т7, обладающий улучшенным сродством к ДНК-матрице во время реакции БСБ, что позволяет повысить выход целевого продукта.

Впервые с использованием синергизма нового мутантного вектора pEt42mut и химерной ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактериофага Т7 с повышенной аффинностью к ДНК-матрице была реконструирована инновационная система БСБ (подтверждено патентом РФ № 23287), обладающая улучшенными свойствами по сравнению с известными из литературы аналогами, что позволило получить ряд хозяйственно ценных белков таких, как аденозиндезаминаза *E. coli*, дигуанилатциклаза *T. maritima*, диамант-ДНК-полимераза, браззеин и субъединица бактериального токсина, синтез которых в традиционной цельноклеточной системе трансляции затруднен или невозможен.

Положения, выносимые на защиту.

1. Введение в сайт репликации *ori* точечной мутации в 148 положении полинуклеотидной цепи с заменой цитозина на аденин и одновременное удаление гена *rop* в коммерческой плазмиде pET42a(+) обеспечивает увеличение копийности плазмиды по сравнению с родительской на порядок, что позволяет упростить способ ее выделения из клеток-хозяев и соответственно снизить затраты на ее получение.

2. Созданный рекомбинантный штамм *E. coli* pet42-T7S продуцирует химерный белок, состоящий из ДНК-аффинного домена – *SSo7d* (изолированного из *S. solfataricus*) и T7-РНК-полимеразы, способный за счет более высокого сродства РНК-полимеразы с ДНК-матрицей повышать эффективность системы БСБ до 14 %. Штамм характеризуется продуктивностью по *SSo7d*-T7-РНК-полимеразе, составляющей 4 000 ед/л культуральной жидкости (КЖ).

3. Сконструированные штаммы *E. coli* Qbra42 и *E. coli* 42eLTV способны синтезировать браззеин и субъединицу бактериального токсина с продуцирующими способностями 140 мг/л и 480 мг/л КЖ, что превышает аналогичные показатели лучших из известных штаммов-продуцентов в 1,6 раза и в 1,37 раз соответственно.

4. Использование системы БСБ для синтеза браззеина и субъединицы «В» бактериального токсина *E. coli* приводит к получению целевых белков в растворенном состоянии, что упрощает их дальнейшую очистку и обеспечивает повышение волюметрического выхода в 57 раз и 3,33 раза по сравнению с аналогичными процессами, предусматривающими цельноклеточный синтез соответственно.

5. Получение аденозиндезаминазы *E. coli* и дигуанилатциклазы *T. maritima* в системе БСБ обеспечивает повышение волюметрических выходов по сравнению с биосинтезом этих белков в цельноклеточных системах в 530 и 12 500 раз соответственно.

Личный вклад соискателя ученой степени. Диссертантом сформулированы цель и задачи исследования, разработаны подходы для их решения. Экспериментальные данные, полученные в ходе работы, проанализированы и статистически обработаны. Соавторами соискателя выступают сотрудники лаборатории молекулярной биотехнологии Института микробиологии НАН Беларуси, в которой выполнялась работа, а также сотрудники отдела бактериальных инфекций крупного рогатого скота Института экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского, проводившие изучение биологической активности полученных препаратов субъединицы бактериального токсина.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов. Основные результаты работы были представлены на 15-й и 20-й международных научных конференциях «Сахаровские чтения 2016 и 2020 года: экологические проблемы XXI века» (Минск, 2016 и 2020); X-ой и XI-ой международных научных конференциях «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 2017 и 2019); VII-ой международной научной конференции молодых ученых, аспирантов, магистрантов, студентов (на англ. языке) «Актуальные экологические

проблемы» (Минск, 2017); 22-ой международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2018); 82-ой научно-технической конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов Белорусского государственного технологического университета (с международным участием) (Минск, 2018); 8-ом Европейском Конгрессе микробиологов FEMS (Глазго, 7–11 июля 2019 г.).

Препарат субъединицы бактериального токсина использовался в Институте экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского в качестве антигена в тест-системы ИФА для детекции специфических антител в крови крупного рогатого скота, а также при создании вакцины «Колитокс-ЛТ» для профилактики колибактериоза (эшерихиоза) и клебсиеллеза крупного рогатого скота (акт о практическом использовании результатов диссертационного исследования от 17 марта 2021 г.). Результаты диссертационной работы используются в процессе выполнения лабораторной работы по дисциплине «Биотехнология» МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ (акт о внедрении результатов кандидатской диссертации в учебный процесс от 1 февраля 2019 г.) [23].

Опубликование результатов диссертации. По материалам диссертации опубликовано 23 работы, из них 10 статей в рецензируемых научных изданиях, 6 статей – в материалах конференций и конгрессов, тезисы 5 докладов. Получен 1 патент Республики Беларусь и 1 положительное решение на получение патента РБ. Опубликованы 1 учебно-методические материалы. Количество страниц опубликованных материалов – 103. Общий объем опубликованных материалов – 5,7 авторских листа. На статьи, соответствующие пункту 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, приходится 4,4 авторских листа.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, 6 глав, заключения, библиографического списка, приложений. Работа изложена на 119 страницах машинописного текста, содержит 16 таблиц на 15 страницах, 30 рисунков на 26 страницах, 20 приложений на 27 страницах.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В работе приведены литературные данные об использовании БСБ в разных областях науки и хозяйственной деятельности человека, приведены основные компоненты и основные этапы приготовления данной системы. Описаны способы получения хозяйственно ценных рекомбинантных белков с использованием БСБ. Особое внимание уделено получению фармакологически значимых белков, которые используются для приготовления современных лекарственных субстанций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали штаммы бактерий *E. coli* BL21(DE3) и *E. coli* DH5 α («Novagen», США), бактериофаг T7 («ВКППН», Россия), *Saccharomyces cerevisiae* БИМ Y-54 («Белорусская коллекция непатогенных микроорганизмов», Беларусь) и *S. solfataricus* P2 (коллекция лаборатории молекулярной биотехнологии Института микробиологии НАН Беларуси, Беларусь).

Подбор олигонуклеотидных праймеров для полимеразной цепной реакции (ПЦР) осуществляли с использованием биоинформационного программного обеспечения Vector NTI 9.0 («ThermoFisher», США) на основании нуклеотидных последовательностей генов, указанных в таблице 1. На 5'-конец праймера для амплификации была добавлена нуклеотидная последовательность, комплементарная вектору pET42a(+).

Таблица 1. – Гены, использованные в работе

Ген	Кодирующий белок	Источник гена	GeneID из базы данных GenBank
<i>T7p07</i>	РНК-полимераза бактериофага T7	Бактериофаг T7	1261050
<i>SSO_RS12375</i>	<i>SSo7d</i> -домен	<i>S. solfataricus</i>	1454006
<i>add</i>	Аденозиндезаминаза	<i>E. coli</i>	945851
<i>TM_RS09105</i>	Дигуанилатциклаза	<i>T. maritima</i>	897742
<i>GUK1</i>	Гуанилаткиназа	<i>S. cerevisiae</i>	852065
<i>URA6</i>	Уридилаткиназа	<i>S. cerevisiae</i>	853844
<i>cmk</i>	Цитилаткиназа	<i>E. coli</i>	945535

Необходимые гены амплифицировали с помощью ПЦР с использованием синтетических праймеров и геномных ДНК: *E. coli* BL21(DE3), бактериофага T7, *S. cerevisiae* БИМ Y-54 и *S. solfataricus* P2.

Введение точечной мутации в сайт репликации *ori* коммерческой плазмиды pET42a(+) и удаление из нее гена *rop* осуществляли методом ПЦР. В результате был получен новый генетический вектор, названный pEt42mut. Полученный вектор верифицировали с помощью рестрикционного анализа и секвенирования с использованием прибора «Beckman Coulter GenomeLab GeXP™» на базе государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» (Минск, Беларусь).

Для расчета количества копий плазмиды использовали метод ПЦР в режиме реального времени с двумя мишенями: первая мишень – известная нуклеотидная последовательность, которая присутствует в геномной ДНК *E. coli*, вторая – ген, нуклеотидная последовательность которого находится в мутантной плазмиде. Постановку ПЦР осуществляли с использованием премикса, содержащего флуоресцентный краситель SybrGreen и инактивированную *Taq*-полимеразу («АртБиоТех», Беларусь), с помощью прибора CFX96 («Bio-Rad», США). В качестве матрицы использовали нуклеиновый материал, полученный путем выделенный из клеточной биомассы и его последующего разведения; количество каждого праймера в ПЦР составило по 7,5 пмоль.

Клонирование проводили по методикам, описанным в руководстве (Sambrook et al., 2012). При создании векторов и штаммов применяли методы безлигазного клонирования, рестрикции, лигирования и трансформации. В результате были получены штаммы *E. coli*:

- pET42-T7RNA – продуцент рекомбинантной T7-РНК-полимеразы;
- pet42-T7S – продуцент химерной *Sso7d*-T7-РНК-полимеразы;
- gmk – продуцент гуанилаткиназы *S. cerevisiae*;
- umk – продуцент уридилаткиназы *S. cerevisiae*;
- cmk – продуцент гомологичной цитилаткиназы;
- Qbra42 – продуцент браззеина;
- 42eLTV – продуцент рекомбинантной субъединицы бактериального токсина.

Глубинное культивирование клеток полученных штаммов осуществляли в питательной среде ZYM505 с добавлением селективного антибиотика – канамицина до конечной концентрации 100 мкг/мл. Клетки *E. coli* выращивали до оптической плотности КЖ 0,6 ($\lambda=600$ нм), затем проводили индукцию синтеза белка путем внесения изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) до конечной концентрации 0,5 мМ и продолжали культивирование в течение 3 ч.

Клетки разрушали с использованием ультразвукового дезинтегратора Sonifier-450 («Branson», США) при мощности 0,05 кВт (600 импульсов по 0,5 с).

Выделение и очистку рекомбинантных белков из бактериальных лизатов клеток осуществляли с использованием металл-аффинной хроматографии на

колонке с Ni-NTA-агарозой («Qiagen», США). Белок в образцах определяли методом Брэдфорд (Walker, 2002).

Анализ полученных белков проводили с использованием электрофореза в полиакриламидном геле (денатурирующие условия) по Лэммли. Пробоподготовку, фиксацию и окрашивание геля проводили в соответствии с общепринятыми экспериментальными протоколами (Green et al., 2012).

Детекцию активности T7-РНК-полимеразы проводили в реакционной смеси, содержащей 20 мМ Трис-НСl-буфер (рН 8,0), 6 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотреитола, 0,5 мМ смесь 4-х природных рибонуклеозидтрифосфатов, 0,2 мкг ДНК и фермент, которую инкубировали при 37 °С в течение 60 мин. За единицу активности фермента принимали такое количество, которое по флуоресценции соответствовало 1 ед. коммерческого препарата T7-РНК-полимеразы («JenaBioscience», Германия). Активность фермента выражали в ед/мл ферментного препарата.

Источником клеточного лизата *E. coli*, пригодного для постановки реакции БСБ, служили осажденные клетки, полученные после глубинного культивирования на питательной среде YТ с внесением ИПТГ до конечной концентрации 1,0 мМ. Клеточный осадок подвергали гомогенизации под высоким давлением в ИБОХ НАН Беларуси. Полученный лизат осветляли центрифугированием, инкубировали при температуре 37 °С в течение 90 мин и диализовали против 1000-кратного объема 10 мМ трис-ацетатного буфера (рН 8,2), содержащего 60 мМ ацетат калия и 1 мМ ацетат магния.

Для синтеза целевого белка в системе БСБ реакционную смесь (1,0 мл), содержащую 0,25 мл клеточного лизата *E. coli*, 0,65 мл премикса (включающий необходимые компоненты для проведения реакции), 5000 ед РНК-полимеразы и 500 нг плазмидной ДНК (содержащей ген, кодирующий целевой белок), инкубировали при температуре 30 °С в течение 5–14 ч.

За единицу активности полученных во время реакции БСБ ферментов принимали такое их количество, которое обеспечивало образование 1 мкмоля целевых продуктов за 1 мин в соответствующих условиях реакции. Активность ферментов выражали в ед/мл реакционной смеси.

Для анализа эффективности реакций БСБ рассчитывали волюметрический выход реакции, который определяется как количество целевого продукта, получаемого с ед. объема КЖ или реакционной смеси (R. Subrahmanyam et al., 2015).

Для статистической обработки данных использовали методы, принятые в биологии (Quirk, 2016). Большинство приведенных в работе данных экспериментов являются усредненными величинами 3–5 опытов. Доверительный интервал рассчитывали по критерию Хи-квадрат с поправкой Йейтса. Все расчёты проводились в компьютерной программе «Microsoft Excel».

РЕКОНСТРУКЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ БЕСКЛЕТОЧНОГО СИНТЕЗА БЕЛКА

Система бесклеточного синтеза белка предусматривает создание реакционной смеси из лизата клеток различных живых организмов, рекомбинантной плазмидной ДНК, содержащей ген, кодирующий необходимый целевой белок, РНК-полимеразы (для транскрипции гена) и премикса – раствора, который содержит четыре канонических НТФ (субстраты для РНК-полимеразы), АТФ как источник энергии, аминокислоты и буферную систему для поддержания необходимого рН среды.

Как известно, одним из популярных векторов, который используется в генной инженерии, является рЕТ42a(+), включающий в себя последовательность Т7-промотора и Т7-терминатора. С данного промотора осуществляется синтез мРНК специфичным для этого промотора ферментом – ДНК-зависимой РНК-полимеразой бактериофага Т7. Вышеупомянутый вектор является низкокопийным, что создает сложности с получением нужной для реакции БСБ концентрации плазмиды (не менее 400 нг/мкл).

В настоящей работе с использованием направленного мутагенеза в сайт репликации *ori* коммерческой плазмиды рЕТ42a(+) была введена точечная мутация С₁₄₈→А и одновременно удален ген *rop*, что позволило сконструировать новую плазмиду, названную рEt42mut. Полученная плаزمиды была верифицирована секвенированием и апробирована в реакции БСБ. При помощи ПЦР в режиме реального времени установлено, что плазмиды рEt42mut обладает копийностью на порядок большей, чем родительский рЕТ42a(+)-вариант [2, 20].

Применяя экспрессирующий вектор рЕТ42a(+), получены штаммы *E. coli* gmк, *E. coli* umк и *E. coli* смк – продуценты рекомбинантной гуанилаткиназы *S. cerevisiae*, уридилаткиназы *S. cerevisiae* и гомологичной цитидилаткиназы, соответственно, молекулы которых содержат на своем С-конце дополнительный октагистидиновый олигопептид. Этот пептид способен аффинно связываться с ионами никеля, что предоставляет возможность выделять такие модифицированные белки из клеточных лизатов с помощью металл-аффинной хроматографии. Продуцирующая способность штаммов в отношении нуклеозидкиназ составила: для *E. coli* gmк – 210 тыс. ед/л КЖ, для *E. coli* umк – 1500 тыс. ед/л КЖ, для *E. coli* смк – 123 тыс. ед/л КЖ [3, 12].

Проведено масштабирование процессов синтеза и выделения НТФ из реакционной смеси с использованием вышеупомянутых ферментов и нуклеозиддифосфаткиназы (Институт микробиологии НАН Беларуси, Беларусь). Выходы уридин-5'-трифосфата (УТФ), цитидин-5'-трифосфата (ЦТФ) и гуанозин-5'-трифосфата (ГТФ) составили 50–55 %, 30–35 %, 60–65 %

соответственно. В результате выполнения этого раздела работы было получено 30 мг ГТФ, 21 мг УТФ, 15 мг ЦТФ.

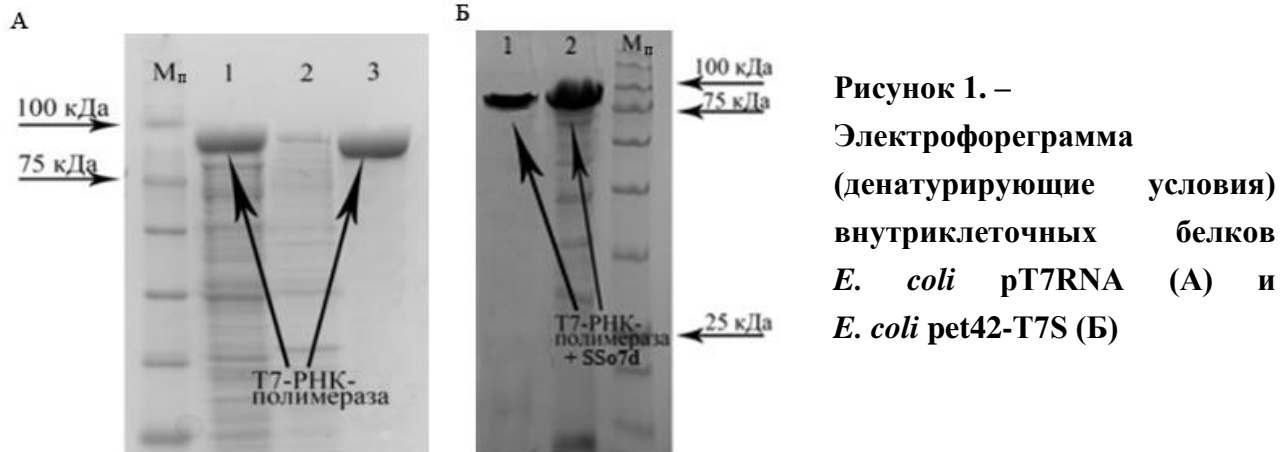
Содержание основного вещества в препаратах всех трех НТФ превышало 95 % по данным обратнофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии [3, 12].

Разработан лабораторный регламент на производство наборов реагентов для бесклеточного синтеза белка ЛР-10/2017 от 27 декабря 2017 г.

СОЗДАНИЕ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ НАТИВНОЙ И ХИМЕРНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ БАКТЕРИОФАГА Т7

С использованием современного генно-инженерного инструментария были клонированы ген *SSO_RS12375*, кодирующий *Sso7d*-домен, и ген *t7p07*, кодирующий Т7-РНК-полимеразу, и встроены в плазмиду рЕТ42a(+) под контролем сильного Т7-промотора. В результате были созданы новые плазмиды рЕТ42-t7p07 и рЕТ42-St7p07. Полученными генетическими конструкциями трансформировали компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3), что позволило создать новые штаммы-продуценты, которые были нами названы *E. coli* рТ7RNA и *E. coli* рет42-T7S. Клетки этих штаммов, соответственно, несут гены нативного и химерного варианта Т7-РНК-полимеразы и обладают продуцирующей способностью, равной 5 040 и 4 000 ед/л КЖ [1, 4, 11, 18].

При культивировании вышеуказанных штаммов были подобраны условия экспрессии целевых белков, схемы их очистки с использованием металл-аффинной хроматографии на Ni-NTA-смоле (рисунок 1) и охарактеризованы основные условия, в которых РНК-полимеразы проявляют максимальную активность. Были изучены различные буферные компоненты: Трис-НСl (рН 7,0–9,0), Трис-ацетат (рН 7,0–9,0) и Хепес-КОН (рН 7,0–8,0); концентрация хлорида натрия в диапазоне 5–25 мМ в реакции, концентрация ионов магния в диапазоне от 0 до 25 мМ в реакции, температура инкубации реакционной смеси в диапазоне от 25 до 40 °С и концентрация спермидина в диапазоне от 0 до 5 мМ.



Экспериментальная сравнительная проверка нативной и химерной формы Т7-РНК-полимеразы показала, что наличие у РНК-полимеразы ДНК-аффинного домена приводит к повышению волюметрического выхода бесклеточного синтеза, и превосходит этот показатель, достигаемый с использованием исходного варианта фермента, до 14 % (рисунок 2).

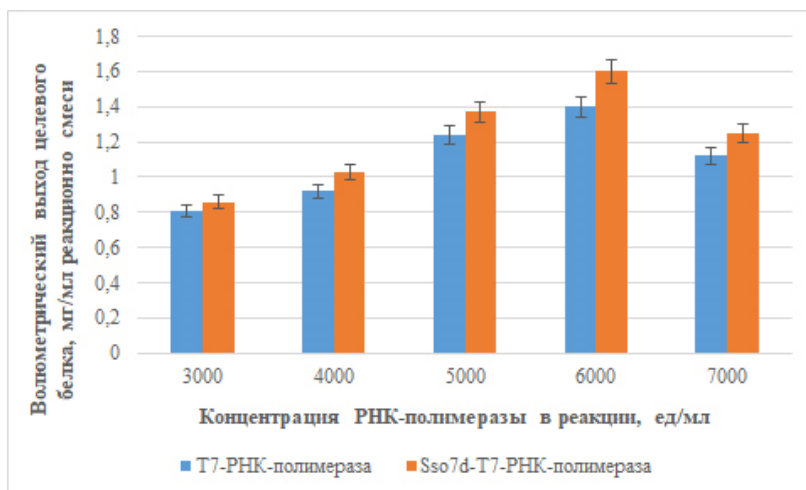


Рисунок 2. – Эффективность системы БСБ при использовании двух различных РНК-полимераз

Разработана технологическая инструкция на производство препарата очищенной рекомбинантной Т7-РНК-полимеразы от 27 марта 2017 г.

СОЗДАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ БРАЗЗЕИНА И СУБЪЕДИНИЦЫ БАКТЕРИАЛЬНОГО ТОКСИНА

С использованием экспрессирующего вектора pET42a(+) созданы новые рекомбинантные штаммы *E. coli* – продуценты:

- субъединицы гомологичного бактериального токсина (штамм *E. coli* 42eLTb);

- браззеина (штамм *E. coli* Qbra42; ген древесного растения *Pentadiplandra brazzeana*).

Продуцирующая способность штамма *E. coli* составила 480 мг субъединицы бактериального токсина с 1 л КЖ, что превышает аналогичный показатель известного из литературы штамма в 1,37 раза (Kozuka et al., 2000) [9, 15, 16, 19].

Продуцирующая способность штамма *E. coli* Qbra42 составила 140 мг браззеина с 1 л КЖ. Следует отметить, что в настоящее время в литературе описан биотехнологический способ получения белка с использованием дрожжевой системы экспрессии, при котором максимальный выход составляет 90 мг с 1 л КЖ. Из сравнения этих показателей следует, что продуцирующая способность полученного нами штамма превышает продуктивность литературного аналога в 1,6 раза (Poirier et al., 2012) [5, 13, 14].

Разработана лабораторная технология ЛР-2/2021 от 12 июля 2021 г. на производство препарата рекомбинантной субъединицы бактериального токсина с использованием штамма-продуцента *E. coli* 42eLTb. Получено положительное решение на выдачу патента РБ на изобретение «Рекомбинантный штамм бактерий *Escherichia coli*, продуцирующий субъединицу В термолabile токсина *Escherichia coli*» по заявке № а20200248 от 21.12.2020. Разработаны технические условия ТУ ВУ 100289066.171-2021 от 27 сентября 2021 г. на производство рекомбинантной субъединицы бактериального токсина.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИСТЕМЫ БЕСКЛЕТОЧНОГО СИНТЕЗА БЕЛКА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫХ БЕЛКОВ

Для бесклеточного синтеза браззеина и субъединицы бактериального токсина использовали ранее полученные плазмиды pET42-Qbra и pET42-eLTb соответственно. При этом волюметрические выходы реакций составили 2 мг/мл и 1,6 мг/мл реакционной смеси соответственно, что превышает выходы этих целевых продуктов, достигаемые при синтезе с использованием цельных клеток в 57 раз и 3,33 раза соответственно (рисунок 3) [6, 7, 21, 22].

На следующей стадии работы осуществлен синтез браззеина и субъединицы бактериального токсина в препаративном объеме (1 и 4 мл соответственно). В дальнейшем эти белки были выделены с использованием металл-аффинной хроматографии. Чистота полученных белковых препаратов была проанализирована электрофоретически. Чистота бактериального токсина достигла более 95 %, а браззеина – более 98 % [6, 7, 21, 22].

Разработана лабораторная технология ЛР-3/2021 от 12 июля 2021 г. на производство препарата рекомбинантной субъединицы бактериального токсина

с использованием системы БСБ. Получен патент РБ № 23287 на изобретение «Способ получения браззеина» [22].

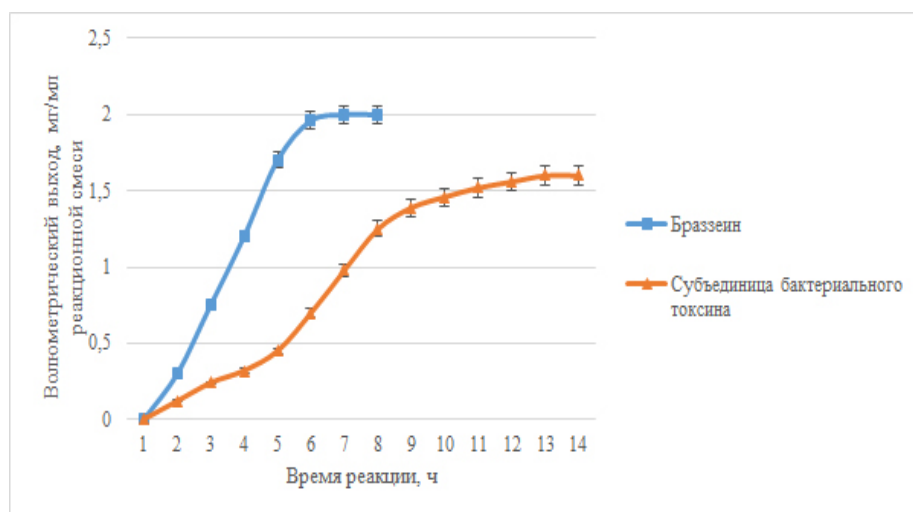


Рисунок 3. – Динамика накопления браззеина и субъединицы бактериального токсина в реакционной смеси при бесклеточном синтезе этих белков

На заключительном этапе работы, для получения ряда хозяйственно ценных белков в системе БСБ были созданы новые генетические конструкции на основе сконструированного нами мутантного вектора рЕТ42mut (таблица 2).

Таблица 2. – Созданные генетические конструкции

Генетическая конструкция	Ген	Кодирующий белок	Источник гена
рЕТ42mut-add	<i>add</i>	аденозиндезаминаза (АДаза)	<i>E. coli</i>
рЕТ42mut-dgc	<i>TM_RS09105</i>	дигуанилатциклаза (ДГЦ)	<i>T. maritima</i>
рЕТ42mut-STaq	<i>SSO_RS12375-taq</i>	Химерный белок, состоящий из <i>Taq</i> -ДНК-полимеразы и ДНК-связывающего домена бактерии <i>S. solfataricus</i> (Диамант-ДНК-полимераза)	Синтетическая конструкция (Korovashkina et al., 2012)

Концентрации АДазы, ДГЦ и диамант-ДНК-полимеразы в полученных препаратах, синтезированных при использовании системы БСБ, составили 530 ед/мл, 45 ед/мл и 250 ед/мл реакционных смесей соответственно (рисунок 4).

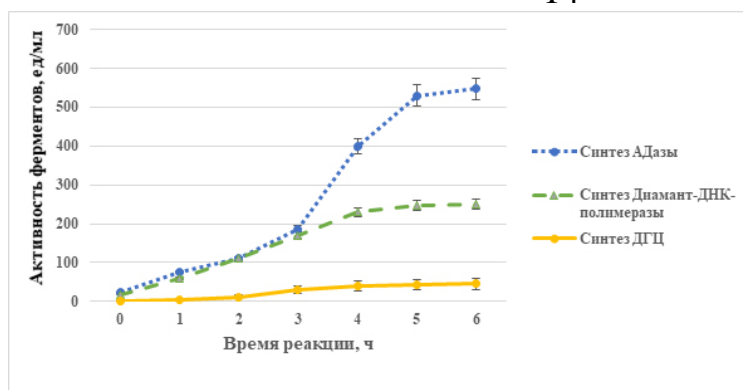


Рисунок 4. – Динамика накопления АДазы, ДГЦ и диамант-ДНК-полимеразы в реакционной смеси при бесклеточном синтезе этих белков

Следует отметить, что при получении данных белков в цельноклеточных системах экспрессии, их максимальная концентрация в КЖ составляла соответственно 1,0 ед/мл, 0,0036 ед/мл и 240 ед/мл. Как можно заметить, уровень экспрессии диамант-ДНК-полимеразы близок к цельноклеточному уровню, что может свидетельствовать о не оптимально подобранных условиях синтеза этого фермента в системе БСБ и необходимости дальнейшего изучения этого процесса [8, 10, 17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. При введении в сайт репликации *ori* точечной мутации C₁₄₈→A и одновременном удалении гена *rop* в векторе pET42a(+) получена новая плазмида, названная pEt42mut. Созданная плазмида характеризуется по сравнению с родительской на порядок повышенной копийностью. Использование такой плазмиды позволяет упростить способ ее выделения из клеток-хозяев и, соответственно, снизить затраты на ее получение [2, 20].

2. С помощью генной инженерии созданы: штамм *E. coli* gmk – продуцент гуанилаткиназы *S. cerevisiae*, штамм *E. coli* umk – продуцент уридилаткиназы *S. cerevisiae* и штамм *E. coli* cmk – продуцент гомологичной цитилаткиназы. Продуцирующая способность составляет для штамма *E. coli* gmk (продуцент гуанилаткиназы *S. cerevisiae*) – 210 тыс. ед/л КЖ, для штамма *E. coli* umk (продуцент уридилаткиназы *S. cerevisiae*) – 1500 тыс. ед/л КЖ, для штамма *E. coli* cmk (продуцент гомологичной цитилаткиназы) – 123 тыс. ед/л КЖ. Подобраны условия реакций синтеза НТФ с использованием очищенных гуанилат-, уридилат- и цитилаткиназ, а также нуклеозиддифосфаткиназы. Выходы УТФ, ЦТФ и ГТФ (в расчёте на введенный в реакцию НМФ) составили 50–55 %, 30–35 %, 60–65 % соответственно. В результате препаративного синтеза НТФ было получено 30 мг ГТФ, 21 мг УТФ и 15 мг ЦТФ с чистотой более 95 % [3, 12].

3. Сконструированы новые штаммы *E. coli*, продуцирующие Т7-РНК-полимеразу и химерную *Sso7d*-Т7-РНК-полимеразу. Продуцирующие способности штаммов составили 5 040 и 4 000 ед/л КЖ соответственно. Впервые показано, что использование в системе БСБ Т7-РНК-полимеразы, к молекуле которой добавлен ДНК-аффинный домен *Sso7d*, повышает выход целевых продуктов до 14 % [1, 4, 11, 18].

4. Созданы рекомбинантные штаммы *E. coli* Qbra42 и *E. coli* 42eLTb, продуцирующие белок сладкого вкуса браззеин и субъединицу бактериального токсина соответственно. Полученные штаммы обладают продуцирующей способностью 140 мг белка и 480 мг белка с 1 л КЖ соответственно, что в 1,6 и в 1,37 раза превышает показатели лучших штаммов-продуцентов, описанных в литературе [5, 9, 13, 14, 15, 16, 19].

5. Впервые для синтеза браззеина и субъединицы бактериального токсина использовали систему БСБ. При этом волюметрические выходы реакций составили 2 мг/мл и 1,6 мг/мл реакционной смеси соответственно, что превышает выходы целевых продуктов, достигаемых при синтезе с использованием цельных клеток в 57 и 3,33 раза соответственно [6, 7, 21, 22].

6. Впервые система БСБ использована для получения таких бактериальных ферментов, как АДаза и ДГЦ. После частичной оптимизации условий

проведения процесса БСБ его эффективность составила 530 ед/мл (для АДазы) и 45 ед/мл (для ДГЦ). Превышение волюметрических выходов этих ферментов над выходами, достигнутыми с использованием цельноклеточных систем экспрессии составило в 530 и 12 500 раз соответственно [8, 10, 17].

Рекомендации по практическому использованию результатов

К практическому использованию рекомендуются: рекомбинантные штаммы бактерий в качестве продуцентов уридилаткиназы *S. cerevisiae*, гуанилаткиназы *S. cerevisiae*, цитилаткиназы *E. coli*, T7-РНК-полимеразы, химерной *Sso7d*-T7-РНК-полимеразы, браззеина и субъединицы бактериального токсина; высококопийная плазида pEt42mut; технологическая инструкция на производство препарата очищенной рекомбинантной T7-РНК-полимеразы от 27 марта 2017 г.; лабораторные регламенты на производство набора реагентов для бесклеточного синтеза белка ЛР-10/2017 от 27 декабря 2017 г., субъединицы бактериального токсина ЛР-2/2021 от 12 июля 2021 г. и ЛР-3/2021 от 12 июля 2021 г.; технические условия на производство препарата рекомбинантной субъединицы бактериального токсина ТУ ВУ 100289066.171-2021 от 27 сентября 2021 г.

Результаты исследований используются в Институте экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского в качестве антигена при разработке тест-системы ИФА для детекции специфических антител в крови крупного рогатого скота, а также при создании вакцины «Колитокс-ЛТ» для профилактики колибактериоза (эшерихиоза) и клебсиеллеза крупного рогатого скота (акт о практическом использовании результатов диссертационного исследования от 17 марта 2021 г.).

Получен патент РБ № 23287 на изобретение «Способ получения браззеина» [22] и положительное решение № а20200248 от 27.08.2021 на выдачу патента РБ на изобретение «Рекомбинантный штамм бактерий *Escherichia coli*, продуцирующий субъединицу В термолабильного токсина *Escherichia coli*».

Результаты исследований внедрены в учебный процесс МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ и опубликованы в практикуме по дисциплине «Медицинская биотехнология» [23] (акт о внедрении результатов кандидатской диссертации в учебный процесс от 1 февраля 2019 г.).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях:

1. Создание рекомбинантного штамма *Escherichia coli* – продуцента РНК-полимеразы бактериофага Т7 / **И. С. Казловский**, А. Н. Рымко, С. В. Квач, А. И. Зинченко // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]. – Минск, 2016. – Т. 8. – С. 72–81.

2. **Казловский, И. С.** Модификация экспрессионной рЕТ-системы для использования в бесклеточном синтезе белка / **И. С. Казловский**, А. Н. Рымко, А. И. Зинченко // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]. – Минск, 2018. – Т. 10. – С. 69–78.

3. Создание рекомбинантных штаммов *Escherichia coli* – продуцентов гуанилат-, уридилат- и цитидилаткиназ / Д. В. Бурко, **И. С. Казловский**, А. Н. Рымко, А. И. Береснев, А. Б. Булатовский, И. В. Бельская, А. И. Зинченко // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. тр. / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]. – Минск, 2018. – Т. 10. – С. 12–22.

4. **Казловский, И. С.** Создание штамма-продуцента химерного белка, состоящего из РНК-полимеразы и ДНК-аффинного домена / **И. С. Казловский**, А. И. Зинченко // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 5. – С. 601–607.

5. **Казловский, И. С.** Создание рекомбинантного штамма *Escherichia coli* – продуцента сладкого белка браззеина / **И. С. Казловский**, И. В. Бельская, А. И. Зинченко // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]. – Минск, 2019. – Т. 11. – С. 93–101.

6. **Казловский, И. С.** Биосинтез браззеина в бактериальной системе бесклеточного синтеза белка / **И. С. Казловский**, И. В. Бельская, А. И. Зинченко // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2020. – Т. 64, № 1. – С. 71–77.

7. Синтез субъединицы В термолabile токсина *Escherichia coli* в бактериальной системе бесклеточного синтеза белка / **И. С. Казловский**, И. В. Бельская, А. В. Соловьёва, А. И. Зинченко, О. Н. Новикова, Ю. В. Ломако // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]. – Минск, 2020. – Т. 12. – С. 90–99.

8. The use of a cell-free protein synthesis for obtaining bacterial diguanylatcyclase and two chimeric proteins / **I. S Kazlouski**, I. V. Belskaya, A. V. Bulatovskiy, A. I. Zinchenko // Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии Нац. акад. наук Беларуси. – Минск, 2021. – Т. 30. – С. 105–109.

9. Создание рекомбинантного штамма *Escherichia coli*, продуцирующего субъединицу гомологичного термолабильного токсина / **И. С. Казловский**, А. И. Зинченко, А. В. Соловьева, О. Н. Новикова, Ю. В. Ломако // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2021. – Т. 65, № 2. – С. 185–190.

10. **Казловский, И. С.** Биосинтез аденозиндезаминазы *Escherichia coli* в системе бесклеточного синтеза белка / **И. С. Казловский**, А. И. Зинченко // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2021. – Т. 66, № 3. – С. 271–276.

Статьи в материалах конференций и конгрессов:

11. Получение и выделение рекомбинантной РНК-полимеразы бактериофага T7 / **И. С. Казловский**, А. Н. Рымко, С. В. Квач, А. И. Зинченко // Сахаровские чтения 2016 года: экологические проблемы XXI века : материалы 16-й междунар. науч. конф., Минск, 19–20 мая 2016 г. / [Междунар. гос. экол. ин-т им. А. Д. Сахарова Белорус. гос. ун-та и др. ; под общ. ред. С. А. Маскевича, С. С. Позняка, Н. А. Лысухо]. – Минск, 2016. – С. 72.

12. Engineering of *Escherichia coli* strains – producers of guanosine monophosphate- and cytidine monophosphate kinases / **I. Kazlovskiy**, D. Burko, A. Rymko, A. Zinchenko // Actual environmental problems: proc. of the VII Intern. sci. conf. of young scientists, graduates, master and PhD students, 23–24 Nov. 2017, Minsk, Rep. of Belarus / Belarusian state univ., Intern. Sakharov Environmental Inst.; ed. by S. A. Maskevitch, S. S. Poznjak. – Minsk, 2017. – P. 68–69.

13. **Казловский, И. С.** Создание экспрессионной генетической конструкции, включающей ген браззеина / **И. С. Казловский**, Д. А. Лемеза, А. И. Зинченко // Naukowa przestrzen Europy – 2019: materiały XV miedz. nauk.-prakt. konf., Przemysl, 7–15 kwietnia 2019 r. / Nauka i studia ; redakc.: J. Ciborowski [i in.]. – Przemysl: Nauka i studia, 2019. – P. 43–46.

14. **Казловский, И. С.** Создание рекомбинантного штамма *Escherichia coli* – продуцента браззеина / **И. С. Казловский**, Д. А. Лемеза, А. И. Зинченко // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : материалы XI Междунар. науч. конф., Минск, 3–6 июня 2019 г. / Нац. акад. наук Беларуси [и др. ; орг. ком. конф.: Э. И. Коломиец (пред.) и др.]. – Минск, 2019. – С. 92.

15. Создание генетической конструкции, содержащей ген субъединицы В термолабильного анатоксина *Escherichia coli* / **И. С. Казловский**, И. В. Бельская, А. В. Соловьева, А. И. Зинченко, О. Н. Новикова, Ю. В. Ломако // Сахаровские чтения 2020 г.: экологические проблемы XXI века : материалы 20-й междунар. науч. конф., Минск, 21–22 мая 2020 г. : в 2 ч. / [Междунар. гос. экол. ин-т им. А. Д. Сахарова Белорус. гос. ун-та и др. ; под общ. ред. С. А. Маскевича, М. Г. Герменчук]. – Ч. 2. – С. 66–69.

16. Рекомбинантный штамм *Escherichia coli*, продуцирующий субъединицу В гомологичного термолabile токсина / **И. С. Казловский**, И. В. Бельская, А. В. Соловьева, О. Н. Новикова, Ю. В. Ломако, А. И. Зинченко // Scientific Horizons–2020: materials of the XVI intern. scient. and pract. Conf., Sheffield, 30 Sept. – 7 Oct. 2020 / Science and educ. LTD ; ed.: L. Y. Ostapenko [et al.]. – Sheffield: Science and educ. LTD, 2020. – P. 15–19.

Тезисы:

17. Получение рекомбинантной аденозиндезаминазы *Escherichia coli* с использованием бесклеточной системы синтеза белка / **И. С. Казловский**, И. В. Бельская, А. Н. Рымко, С. В. Квач, Л. А. Ерошевская, А. И. Зинченко // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : тез. докл. X Междунар. науч. конф., Минск, 5–9 июня 2017 г. / Нац. акад. наук Беларуси [и др. ; орг. ком. конф.: Э. И. Коломиец (пред.) и др.]. – Минск, 2017. – С. 54–56.

18. Создание штамма-продуцента химерного белка, включающий аффинный домен к ДНК – SSO7D и T7-РНК-полимеразу / **И. С. Казловский**, Д. В. Бурко, А. И. Береснев, А. И. Зинченко // Технология органических веществ : тез. докл. 82-й науч.-техн. конф. профессорско-преподават. состава, науч. сотр. и аспирантов, Минск, 1–14 февр. 2018 г. / Белорус. гос. технол. ун-т [и др.] ; отв. за изд. И. В. Войтов. – Минск, 2018. – С. 98–99.

19. Экспрессия рекомбинантного белка RLTV в *Escherichia coli* / А. В. Соловьева, О. Н. Новикова, И. В. Бельская, **И. С. Казловский**, А. Б. Булатовский // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии : сб. тез. XVIII Всерос. конф. молодых учен., посвящ. памяти акад. РАСХН Г. С. Муромцева, Москва, 19–20 апр. 2018 г. / Всерос. науч.-исслед. ин-т с.-х. биотехнологии (ВНИИСБ). – Москва, 2018. – С. 198–199.

20. Модификация экспрессионной РЕТ-системы для использования в бесклеточном синтезе белка / **И. С. Казловский**, А. Н. Рымко, А. И. Береснев, А. И. Зинченко // Биология – наука XXI века : 22-я Междунар. Пушин. шк.-конф. молодых учен., Пушкино, 23–27 апр. 2018 г. : сб. тез. / Пушин. науч. центр РАН, Ин-т теорет. и эксперим. биофизики РАН, Совет молодых учен. и специалистов ИТЭБ РАН. – Пушкино, 2018. – С. 79.

21. Kazlouski, I. *Escherichia coli*-based cell-free synthesis of the sweet-tasting protein, brazzein / **I. Kazlouski**, A. Zinchenko // FEMS-2019 : 8th Congr. of Europ. Microbiol., Glasgow, 7–11 July 2019 / Fed. of Europ. Microbiol. Soc. – Glasgow, 2019. – P. 802.

Патент:

22. Способ получения браззеина : пат. ВУ 23287 / А. И. Зинченко, **И. С. Казловский**, И. В. Бельская. – Оpubл. 30.12.2020.

Учебно-методические материалы:

23. Медицинская биотехнология: практикум / А. И. Зинченко, Е. И. Квасюк, К. Я. Буланова, И. В. Коктыш, Н. В. Богданова, А. В. Бакунович, А. Г. Сыса, Л. Л. Биричевская, **И. С. Казловский**, А. Б. Булатовский; МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ. – Минск: Право и экономика, 2020. – 66 с.

РЭЗЮМЕ

Казлоўскі Ілля Сяргеевіч

РЭКАНСТРУКЦЫЯ БЯСКЛЕТАЧНАЙ БАКТЭРЫЯЛЬНАЙ
СІСТЭМЫ ТРАНСЛЯЦЫІ ДЛЯ АТРЫМАННЯ ГАСПАДАРЧА
КАШТОЎНЫХ БЯЛКОЎ

Ключавыя словы: *Escherichia coli*, *Thermotoga maritima*, *Sulfolobus solfataricus*, бясклетачны сінтез бялку (БСБ), адэназіндэзаміназа, РНК-полімераза, дыгуанілатцыклаза, бразеін, субадзінка В тэрмалабільнага таксіну *E. coli*.

Мэта даследавання: рэканструяваць бактэрыяльную бясклетачную сістэму трансляцыі і эксперыментальна абгрунтаваць яе эфектыўнае выкарыстанне для атрымання шэрагу гаспадарча каштоўных бялкоў.

Метады даследавання: БСБ, стандартныя метады геннай інжынерыі, культываванне мікраарганізмаў, электрафарэз, храматаграфія.

Выкарыстаная апаратура: спектрафатометр Solar UV-VIS PB2201 (ЗАТ «СОЛАР»), секвенатар Beckman Coulter GenomeLab GeXP™ (Beckman Coulter), ампліфікатар T100™ Thermal Cycler (BioRad) і інш.

Атрыманыя вынікі і іх навізна. Сістэма БСБ была ўпершыню рэканструявана з выкарыстаннем сінэргізму хімернага бялку, які складаецца з ДНК-афіннага дамена *S. solfataricus* і ДНК-залежнай РНК-полімеразы бактэрыяфага T7, і высокакопійнай мутантавай плазміды pEt42mut, што дазваляе падвышаць валюметрычны выхад БСБ рэакцыі да 14 %. Упершыню з ужываннем дадзенай сістэмы атрыманы ў раствораным стане бразеін і субадзінка бактэрыяльнага таксіну, а таксама шэраг гаспадарча каштоўных бялкоў такіх, як адэназіндэзаміназа *E. coli*, дзігуанілатцыклаза *T. maritima* і Дыямант-ДНК-полімераза.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: новыя рэкамбінантныя штамы-прадцэнты шэрагу гаспадарча важных бялкоў, лабараторныя тэхналогіі атрымання бактэрыяльнага антыгену і бразеіну.

Вобласць ужывання: біятэхналогія, мікрабіялогія, фармакалогія, генная інжынерыя.

РЕЗЮМЕ**Казловский Илья Сергеевич****РЕКОНСТРУКЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЫ ТРАНСЛЯЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫХ БЕЛКОВ**

Ключевые слова: *Escherichia coli*, *Thermotoga maritima*, *Sulfolobus solfataricus*, бесклеточный синтез белка (БСБ), аденозиндезаминаза, РНК-полимераза, дигуанилатциклаза, браззеин, субъединица В термоллабильного токсина *E. coli*.

Цель исследования: реконструировать бактериальную бесклеточную систему трансляции и экспериментально обосновать ее эффективное использование для получения ряда хозяйственно ценных белков.

Методы исследования: БСБ, стандартные методы генной инженерии, культивирование микроорганизмов, электрофорез, хроматография.

Использованная аппаратура: спектрофотометр Solar UV-VIS PB2201 (ЗАО «СОЛАР»), секвенатор Beckman Coulter GenomeLab GeXP™ (Beckman Coulter), амплификатор T100™ Thermal Cycler (BioRad) и др.

Полученные результаты и их новизна. Система БСБ была впервые реконструирована с использованием синергизма химерного белка, состоящего из ДНК-аффинного домена *S. solfataricus* и ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактериофага T7, и высококопийной мутантной плазмиды pEt42mut, что позволяет повышать волнометрический выход БСБ реакции до 14 %. Впервые с применением данной системы получены в растворенном состоянии браззеин и субъединица бактериального токсина, а также ряд хозяйственно ценных белков таких, как аденозиндезаминаза *E. coli*, дигуанилатциклаза *T. maritima* и Диамант-ДНК-полимераза.

Рекомендации по использованию: новые рекомбинантные штаммы-продуценты ряда хозяйственно важных белков, лабораторные технологии получения бактериального антигена и браззеина.

Область применения: биотехнология, микробиология, фармакология, генная инженерия.

SUMMARY**Kazlouski Illia****RECONSTRUCTION OF A BACTERIAL SYSTEM OF CELL-FREE PROTEIN SYNTHESIS FOR OBTAINING ECONOMICALLY VALUABLE PROTEINS**

Key words: *Escherichia coli*, *Thermotoga maritima*, *Sulfolobus solfataricus*, cell-free protein synthesis, adenosine deaminase, RNA polymerase, diguanylate cyclase, brazzein, subunit B of *E. coli* heat-labile toxin.

Aim of investigation: to reconstruct the bacterial system of cell-free protein synthesis (CFPS) and experimentally substantiate its effective use for the production of a number of economically valuable proteins.

Methods of investigation: CFPS, standard genetic engineering techniques, cultivation of microorganisms, electrophoresis, chromatography.

Research equipment: Solar UV-VIS PB2201 spectrophotometer (SOLAR JSC), Beckman Coulter GenomeLab GeXP™ sequencer (Beckman Coulter), T100™ Thermal Cycler (BioRad), etc.

Obtained results and their novelty. The system of CFPS was first reconstructed using the synergism of a chimeric protein consisting of the DNA affinity domain of *S. solfataricus* and the DNA-dependent RNA polymerase of bacteriophage T7 and the high-copy mutant plasmid pEt42mut, which makes it possible to increase the volumetric yield of the CFPS reaction to 14 %. For the first time using this system brazzein and a subunit of a bacterial toxin, as well as a number of economically valuable proteins such as adenosine deaminase *E. coli*, diguanyl cyclase *T. maritima*, and Diamant-DNA polymerase were obtained in a dissolved state.

Recommendations for application: new recombinant strains-producers of a number of economically valuable proteins, laboratory technologies for obtaining bacterial antigen and brazzein.

Application area: biotechnology, microbiology, pharmacology, genetic engineering.

Подписано в печать 16.11.2021 Формат 60x84_{1/16} Бумага офсетная
Печать цифровая Усл.печ.л. 1,3 Уч.изд.л. 1,4 Тираж 60 экз. Заказ 4226
ИООО «Право и экономика» 220072 Минск Сурганова 1, корп. 2 Тел. 8 029 684 18 66
Отпечатано на издательской системе Gestetner в ИООО «Право и экономика»
Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий, выданное
Министерством информации Республики Беларусь 17 февраля 2014 г.
в качестве издателя печатных изданий за № 1/185