

## Гетерологичная экспрессия гена нейтральной протеазы *Bacillus intermedius* в клетках *Bacillus subtilis*

Рудакова Н. Л., Сабирова А.Р., Балабан Н.П., Шарипова М.Р.

аспирант, студент, к.б.н. с.н.с., д.б.н. профессор

Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина, Казань, Россия

E-mail: [puphen@rambler.ru](mailto:puphen@rambler.ru)

Протеазы играют ключевую роль в жизнедеятельности клетки. В связи с этим весьма актуальной является необходимость расширения наших представлений об эволюционном развитии протеиназ, уточнения их классификации, получения исчерпывающей информации о биохимических свойствах этих ферментов, конструирования и описания структуры белков с целью дальнейшего их применения. Целью работы явилось получение высокоочищенного препарата металлопротеазы *B. intermedius* из лабораторного штамма *B. subtilis* AJ 73, дефектного по собственным внеклеточным протеазам и характеристика полученного фермента.

Динамика роста культуры, биосинтеза металлопротеазы и спорообразования показали, что фермент секретируется в стационарной фазе с максимальным уровнем активности на 30-й час роста, при этом количество свободных спор на этот час составляет 8%. В условиях солевого стресса было показано участие системы DegS-DegU в регуляции экспрессии гена металлопротеазы. Анализ влияния deg-мутаций на экспрессию гена металлопротеазы *B. intermedius* в рекомбинантных штаммах *B. subtilis* с делецией и гиперэкспрессией белков DegS и DegU позволил сделать вывод, что двухкомпонентная система DegS – DegU принимает активное участие в регуляции экспрессии гена металлопротеиназы. Однако, контроль со стороны этой системы наблюдается только до 32-го часа культивирования. Далее регуляция экспрессии гена осуществляется другими механизмами. На первом этапе очистки были подобраны условия дробного осаждения металлопротеазы сульфатом аммония, при этом максимальный выход фермента был достигнут в интервале насыщения 0,2 – 0,7 (47,5%), а степень очистки составила 20. Дальнейшими методами очистки являлись гель-хроматография на сефадексе G-100, где степень очистки фермента составила 200, и высокоэффективная жидкостная хроматография (FPLC) на колонке MonoS, позволившая увеличить степень очистки ещё почти на порядок. SDS-электрофорез в ПААГ показал наличие доминирующей полосы с молекулярной массой 38 кДа (металлопротеаза). Ингибиторный анализ показал, что активность фермента полностью подавляется специфическими ингибиторами металлопротеаз (о-фенантролин и ЭДТА). При этом фермент практически нечувствителен к ингибиторам сериновых протеиназ (PMSF и ингибитор трипсина). Изучены некоторые энзиматические свойства высокоочищенного препарата металлопротеазы: рН оптимум фермента лежит в пределах 7,2-7,4, температурный оптимум составляет 65°C. Фермент стабилен в интервале от 37°C до 60°C в течение 20 мин.

### Литература

1. А.Ф. Хазиев, Н.А. Михайлова, М. М. Алсынбаев Изучение свойств высокоочищенной металлопротеазы, продуцируемой *Bacillus subtilis*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2003.
2. D. Kuhn, P. Durrschmidt, J. Mansfeld, R. Ulbrich-Holmann Boilysin and thermolysin in dipeptide synthesis: a comparative study. Biotechnol. Appl. Biochem. 2002.
3. B. Sookkheo, S. Sinchaikul, S. Phutrakul, S. T. Chen Purification and characterization of the highly thermostabile proteas from *Bacillus Stearothermophilus* TLS33. Protein Expr. Purif. 2000.