

Экспрессия и очистка рекомбинантной эндогликозидазы Н (EndoH) в бактериальной системе.

Научный руководитель – Орлова Надежда Александровна

Яровой Тимофей Алексеевич

Студент (специалист)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биотехнологии, Москва, Россия

E-mail: timofey.yarovoy05@mail.ru

Эндогликозидаза Н (EndoH, эндо- β -N-ацетилглюкозаминидаза Н, КФ 3.2.1.96) специфично гидролизует связь между двумя остатками N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) в хитобиозном ядре N-связанных олигосахаридов, если такие олигосахариды относятся к высокоманнозному типу. Уникальной особенностью EndoH является то, что фермент не расщепляет олигосахариды комплексного типа, которые процессируются в аппарате Гольджи животных клеток. Поэтому EndoH широко применяется в биохимическом анализе: обработка клеточных лизатов этим ферментом позволяет по изменению электрофоретической подвижности гликопротеинов определять статус их созревания, локализацию в эндоплазматическом ретикулуме или в аппарате Гольджи. Для рутинного лабораторного использования необходим доступный и активный препарат фермента, что делает актуальной задачей его получения в *Escherichia coli*.

Целью работы было провести экспрессию гена эндогликозидазы Н в *E. coli* и отработать очистку белка.

Кодирующую последовательность гена *EndoH* из *Streptomyces plicatus* оптимизировали для экспрессии в *E. coli*, синтетическую последовательность клонировали в экспрессионный вектор pET28a по сайтам рестрикции *NcoI/XhoI*. Конструкция обеспечивала синтез *EndoH* с C-концевым полигистидиновым (6xHis) кластером. Проводили трансформацию *E. coli* штамма Rosetta2(DE3). Индукцию экспрессии осуществляли добавлением 0.5 мМ ИПТГ при достижении культурой оптической плотности OD600=0.6–0.8; культивировали еще в течение 4 часов при 30°C. Накопление EndoH оценивали с помощью электрофореза в 12% ДСН-ПААГ. Дезинтеграцию клеток проводили ультразвуком после лизиса клеток с неионогенным детергентом и лизоцимом куриного яйца. Очистку целевого белка из растворимой фракции клеточного лизата выполняли методом металлохелатной хроматографии на колонке с лигандом Ni-NTA. Удаление примесей и элюцию осуществляли возрастающими концентрациями имидазола, фракции элюата анализировали электрофоретически.

В результате работы создана рекомбинантная плаزمида pET28a-EndoH, обеспечивающая продукцию фермента в клетках *E. coli*. Показано, что EndoH синтезируется преимущественно в растворимой форме, что свидетельствует о корректном сворачивании ее полипептидной цепи в цитоплазме *E. coli*. Методом металлохелатной хроматографии на Ni-NTA сефарозе успешно выделен свободный от белковых примесей препарат EndoH, с выходом 28.6 мг с 1 литра культуры. Электрофоретический анализ показал, что очищенный белок представлен одной мажорной полосой, соответствующей молекулярной массе около 35 кДа, что соответствует расчетной молекулярной массе EndoH (31 кДа) с учетом торможения белка в геле, вызываемой гексагистидиновым кластером. В препарате также присутствует минорная полоса с увеличенной электрофоретической подвижностью, по-видимому, соответствующая протеолитическому отщеплению N-концевого участка размером около 3 кДа. Полученный препарат может быть использован для проведения дегли-

козилирования рекомбинантных гликопротеинов с целью последующего анализа их структуры.