

S03-16
ГИПЕРПРОДУКЦИЯ СЕРИНОВОЙ ПРОТЕИНАЗЫ НТРА И ЕЕ СВОЙСТВА
Шарафутдинов Иршад Султанович, Гайнутдинова Зухра Рашидовна, Каюмов Айрат
Рашитович
ФГАОУ ВПО К(П)ФУ

В настоящее время при энзимотерапии существуют две взаимосвязанные актуальные задачи: это снижение токсичности протеиназ и возможность управления их ферментативной активностью. Одним из успешных решений этих задач может являться использование протеиназ семейства HtrA – высокоспецифичных ферментов, протеолитическая активность которых модулируется температурой. Использование данного фермента в качестве ранозаживляющего агента потенциально позволит получить низкую токсичность препарата за счет специфичности к денатурированным белкам, а также позволит получить препарат, проявляющий максимум активности при повышенных температурах, наблюдаемых при воспалительных процессах.

Для очистки белка было необходимо получить штамм, обеспечивающий гиперпродукцию рекомбинантного белка HtrA, несущего стреп-таг на С-конце белка. Для этого ген *htrA* клонировали в экспрессионный вектор pDG148, обеспечивающий гиперэкспрессию продукта данного гена в клетках *E. coli*. Фрагмент ДНК, несущий ген *htrA*, получали с помощью ПЦР с геномной ДНК *B. subtilis* 168. Полученной генетической конструкцией трансформировали штамм *E. coli* BL21, рекомбинантные штаммы высевали на агаризованной среде LA с антибиотиком ампициллином. Очистку рекомбинантного белка HtrA со стреп меткой проводили на стреп-тактинсефарозе.

Для очищенной протеиназы HtrA определена её максимальная протеолитическая активность при температуре 30°C и pH 7.0. Значение активности полученной протеиназы значительно ниже в сравнении с трипсином, ферментом, используемым в настоящее время в качестве ранозаживляющего препарата. Так же, трипсин, который предпочитают на данный момент в медицинской практике, имеет оптимум pH 8,5 и проявляет максимальную активность при температуре 50°C. Принимая во внимание, что pH оптимум очищенной нами протеиназы близок к pH оптимуму кожи и крови человека, можно ожидать слабые изменения его свойств, при терапевтическом применении.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 14-04-31635мол_а.