

**Оптимизация ЛКЕ-системы экспрессии путем подбора рекомбинантных сигнальных пептидов для эффективной секреции бациллярных протеиназ**

**Тихонова Анастасия Олеговна**

*Студент (бакалавр)*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

*E-mail: tihonovaao93@gmail.com*

Эффективность секреции ферментов является важным биотехнологическим параметром. В настоящей работе для получения промышленно важных ферментов - сериновых протеиназ бацилл, использовали ЛКЕ-систему экспрессии в сочетании с беспротезным штаммом ВС2036. Для повышения секреции рекомбинантных белков в среду культивирования необходимым условием является наличие сигнального пептида (SP). Были выявлены три сигнальные последовательности (SPPac, SPYngk, SPAsp) *Bacillus megaterium* с наибольшей эффективностью секреции внеклеточной гидролазы *Thermobifida fusca* (в 6 раз выше по сравнению с собственным сигнальным пептидом). Компьютерный анализ рекомбинантных сигнальных пептидов (SPPac, SPYngk, SPAsp) с использованием on-line программы PrediSi (<http://www.predisi.de/>) позволил выявить индекс эффективности секреции для рекомбинантных сигнальных пептидов, который составил - 0,7 для SPPac, 0,99 для SPYngk и 0,81 для SPAsp. Также оценивали сигнальные пептиды сериновых протеиназ AprBp и GseBp *B. pumilus*, индекс эффективности секреции которых составил - 0,6 и 0,67, соответственно. Значение, вычисленное на сервере PrediSi, свидетельствует о том может ли аминокислотная последовательность функционировать в качестве сигнального пептида: если значение (D-score/индекс эффективности) составляет 0.8-1.0 - считают, что аминокислотная последовательность представляет собой сигнальный пептид, значение 0.5-0.7 - говорит о вероятной функции сигнального пептида, значение  $\leq 0.5$  - аминокислотная последовательность не является сигнальным пептидом. Таким образом, использование программного алгоритма PrediSi позволило оценить перспективность секреции целевого белка под контролем различных сигнальных пептидов. Протеолитическую активность рекомбинантных конструкций оценивали на чашках с молочным агаром, в качестве индуктора ЛКЕ-системы экспрессии использовали антибиотик бацитрацин в различных концентрациях (10, 30 и 50 мг/мл). Сравнивали зоны гидролиза конструкций с рекомбинантными сигнальными пептидами и конструкций с генами протеиназ под собственными сигнальными пептидами. Протеолитическая активность субтилиноподобной протеиназы не изменялась в конструкциях с рекомбинантными сигнальными пептидами. Протеолитическая активность глутамилэндопептидазы была выше в 2 раза под контролем рекомбинантного сигнального пептида SPYngk и концентрации бацитрацина - 50 мкг/мл. Таким образом, было показано, что подход с использованием рекомбинантных сигнальных пептидов в сочетании с беспротезными штаммами *B. subtilis*, позволяет повысить выход белка в 2 раза. В дальнейшем, данные конструкции могут быть рекомендованы для получения целевого белка в биотехнологической промышленности.