

ПОЛУЧЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА БАЙКАЛЬСКИХ АМФИПОД ВИДА *EULIMNOGAMMARUS VERRUCOSUS*

Е.Д. Золотовская, П.Б. Дроздова, А.Д. Власевская, М.А. Тимофеев

Иркутский государственный университет, 664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, д. 1
e-mail: zolotovskayaelenad@gmail.com

Защита от воздействия чужеродных объектов, обеспеченная иммунным ответом, играет важную роль для всех организмов. Одним из ключевых компонентов иммунного ответа ракообразных являются антимикробные пептиды (AMPs), которые экспрессируются в гемолимфу иммунными клетками, гемоцитами. Положительно заряженные молекулы антимикробных пептидов способны специфически связываться с отрицательно заряженными мембранами микроорганизмов, вызывая лизис клеток. Около 350 видов эндемичных ракообразных отряда Amphipoda населяющие различные экологические ниши озера Байкал, могли приобрести уникальные особенности иммунного ответа. При этом функции отдельных компонентов иммунной системы байкальских амфипод остаются недостаточно исследованными.

Данная работа посвящена изучению потенциального антимикробного пептида из гемоцитов байкальских амфипод *Eulimnogammarus verrucosus*.

Амфипод отлавливали в литоральной зоне оз. Байкал в районе пос. Листвянка. Гемолимфу отбирали из взрослых особей, с последующей очисткой гемоцитов и выделением белка. Протеом гемоцитов анализировали с применением жидкостной хромато-масс-спектрометрии (LC-MS/MS). Данные были проанализированы с использованием программ SearchGUI v3.3.17 и Peptide Shaker v.1.16.44. В качестве основы для идентификации белков использовали транскриптомную сборку *E. verrucosus* GHNK01.

Поиск белков с антибактериальными свойствами выполняли с использованием инструмента NCBI conserved domain search. Нами был обнаружен низкомолекулярный белок, который назван AMP1. Большую часть AMP1 составляет домен семейства белков анти-липополисахаридных факторов (anti-lipopolysaccharide factor proteins), который способен взаимодействовать с мембранами грамотрицательных бактерий.

Для изучения свойств AMP1 сконструирована векторная последовательность pET20b-AMP1-6His. Плазмида pET20b позволяет эффективно осуществлять гетерологичную экспрессию гена интереса, а также содержит последовательность из шести остатков гистидина, которая необходима для очистки белка интереса методом аффинной хроматографии. Полученной векторной конструкцией трансформировали клетки *Escherichia coli*. С целью снижения базального уровня экспрессии потенциально токсичного AMP1 для трансформации использовали штамм BL21pLysS. Для полного блокирования экспрессии AMP1 клетки выращивали на твердой среде LB с добавлением 1% раствора глюкозы и без нее. На среде с глюкозой размер и количество бактериальных колоний было заметно меньше по сравнению со средой без глюкозы. Экспрессию белка в клетках индуцировали добавлением изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG). Клетки культивировали в жидкой среде с глюкозой и без нее. Для определения оптимальных условий наработки белка интереса, клетки выращивали при температуре 37, 28 или 18 °C в течение суток. При этом наблюдалась медленная скорость размножения бактериальной культуры. Экспрессия AMP1 была показана в культуре без добавления глюкозы, тогда как в среде с глюкозой наработку белка не наблюдали. Было показано, что наибольшее количество белка экспрессируется в течение суток при температуре 28 градусов. Медленный рост бактерий в жидкой среде, а также небольшие размеры колоний косвенно указывают на токсичность плазмиды pET20b-AMP1-6His и проявление антибактериальных свойств AMP1.

Таким образом, нами впервые проанализирован протеом гемоцитов байкальских амфипод и получен низкомолекулярный белок, который является потенциальным антимикробным пептидом.

