

Секция «Биоинженерия и биоинформатика»

Получение рекомбинантного штамма *Escherichia coli*, способного к гиперпродукции фитазы бацилл

Ахметова Алина Ильдусовна

Аспирант

Казанский (приволжский) федеральный университет, Биолого-почвенный, Казань, Россия

E-mail: akhmetova1987@rambler.ru

Кормовые добавки являются незаменимым звеном в цепочке, связывающей кормление сельскохозяйственных животных и получение высокого уровня продуктивности и качества продукции. Из-за недостатка фитазы фитат проходит без изменений по пищеварительному тракту животных и выходит с пометом, который позднее в качестве органического удобрения вносится в почву. Микробные фитазы расщепляют фитаты и переводят фосфор и связанные ионы металлов в доступное для животных состояние (Rao, 2009). Максимально подходящие для использования в животноводстве фитазы до сих пор отсутствуют. Поэтому ведется постоянный поиск новых продуцентов фитаз (Tran, 2010). Фитаза может применяться в биотехнологии и пищевой промышленности при производстве продуктов питания (Konietzny, 2002). Производство фитазы в промышленных масштабах стало возможным только с использованием соответствующей генетической модификации микроорганизмов.

Целью данной работы являлось получение рекомбинантного штамма *Escherichia coli* способного к высокой продукции фитазы *Bacillus ginsengihumi*. В ходе работы был использован почвенный штамм *Bacillus ginsengihumi*, на основании были сконструированы праймеры для амплификации гена фитазы вследствие высокой степени гомологии фитаз бациллярных штаммов. Полученный продукт амплификации гена фитазы лигировали в вектор pET-46 Ek/LIC способного к высокой экспрессии фермента. В основе лигирования лежала система LIC-клонирования, основанная на клонировании без использования лигазы. Полученной смесью трансформировали штамм *E. coli* DH5 α . Рекомбинантные штаммы высевали на среду LA (Лурия-Бертани агаризованная) с добавлением ампициллина. Чтобы убедиться, что отобранные плазмиды содержат в виде вставки ген *phy*, проводили рестрикционный анализ. В результате, были отобран вектор pET-LIC/Phy под №5 со встроенной вставкой гена *phy* *B.ginsengihumi*, которые трансформированы в штамм протеазо-дефицитный штамм *Escherichia coli* Rosseta 2 (DE3) T1^R, из хромосомы которого deletированы гены протеиназ, что катализирует выход белков. Проведенный далее рестрикционный и ПЦР-анализ выделенных из трансформантов плазмид подтвердил, что ген фитазы был встроен в вектор. Электрофорез выявил наличие вставки гена *phy* в вектор, отличающегося на 1149 п.н. от контроля, не содержащего фитазу. Таким образом, нами был ген фитазы *B. ginsengihumi* был клонирован в экспрессионный вектор pET-46-LIC, а также получен рекомбинантный гиперэкспрессионный штамм *E. coli* Rosseta pET-LIC/Phy №5, несущий ген фитазы *B.ginsengihumi* с целью последующего выделения чистого ферментного препарата.

Работа выполнена при финансовой поддержке федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг соглашение №14.А18.21.0575 от 10.08.2012 и гранта РФФИ 12-08-00942а.

Литература

1. 1. Konietzny U., Greiner R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases) // Int. J. Food Sci. Technol. – 2002. – V.37. – P.791-812
2. 2. Rao D.E., Rao K.V., Reddy T.P., Reddy V.D. Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases: An overview // Crit Rev Biotechnol. - 2009. - V.29. - P.182-98.
3. 3. Tran, T.T. A thermostable phytase from Bacillus sp. MD2: cloning, expression and high-level production in Escherichia coli // Lund University. - 2010. - P.287.

Слова благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг соглашение №14.А18.21.0575 от 10.08.2012 и гранта РФФИ 12-08-00942а.