

**Казловский И. С.¹, Радевич Д. С.², Щеколова А. С.²,
Рымко А. Н.², Квач С. В.², Зинченко А. И.^{1,2}**

¹Международный государственный экологический университет имени А.Д.Сахарова,

²Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

СОЗДАНИЕ ШТАММА ПРОДУЦЕНТА ДИАДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ *BACILLUS THURINGIENSIS*

Недавние исследования показали, что циклический 3',5'-диаденилат (c-di-AMP) и другие циклические динуклеотиды, выполняющие функцию вторичных посредников у бактерий, стимулируют иммунную систему позвоночных, что позволяет считать их перспективными терапевтическими средствами и адьювантами для вакцин.

С увеличением исследований, направленных на изучение иммуностимулирующих и иммуномодулирующих свойств c-di-AMP и его аналогов, возрастает потребность в синтезе препаративных количеств данного циклического динуклеотида. В настоящее время его в основном получают химическим способом, недостатками которого являются сложность, дороговизна и не высокий выход целевого продукта. В то же время ферментативный синтез c-di-AMP с использованием бактериальной диаденилатциклазы (ДАЦ) представляет собой одностадийный процесс конденсации двух молекул АТФ.

В научно-технической литературе для синтеза c-di-AMP предложено использовать ДАЦ бактерии *Bacillus thuringiensis*, которая имеет высокую каталитическую активность. Однако в литературе отсутствуют данные о продуцирующей способности рекомбинантных штаммов продуцентов ДАЦ и удельной активности данного фермента.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящей работы явилось создание штамма продуцента ДАЦ и описание основных физико-химических свойств полученного рекомбинантного фермента.

Ген *disA*, кодирующий ДАЦ-синтетазу, был выделен методом ПЦР с использованием в качестве матрицы геномной ДНК *B. thuringiensis* и встроен в вектор pET42a(+). Созданной конструкцией были трансформированы клетки *Escherichia coli* BL21 (DE3).

В результате выполнения работы получен новый генно-инженерный штамм *E. coli* pet42-*btDisA* – продуцент ДАЦ. Выход целевого белка составил 62 мг/л культуральной жидкости. Удельная активность очищенного ферментного препарата ДАЦ составляет 0,12 ед./мг белка. Установлено, что ДАЦ имеет узкую субстратную специфичность и способна использовать в качестве субстрата лишь АТФ. В проведенной работе так же подтверждена возможность применения ДАЦ для препаративного синтеза c-di-AMP.

Таким образом, результаты исследования могут лечь в основу создания препаративного метода получения фармакологически перспективного c-di-AMP.

Kazlovskij I. S., Radevich D. S., Shchokolova A. S., Rymko A. N., Kvach S. V., Zinchenko A. I.

ENGINEERING *ESCHERICHIA COLI* STRAIN PRODUCING DIADENYLATE CYCLASE OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

This study resulted in recombinant strain *E. coli* producing diadenylate cyclase of *B. thuringiensis*. The enzyme yield was 62 mg/L cultural liquid. Specific activity of purified diadenylate cyclase equaled 0.12 U/mg protein. Plausibility of applying diadenylate cyclase for preparative synthesis of c-di-AMP was confirmed.