

УДК 640

ВЛИЯНИЕ N-КОНЦЕВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ СОИ *GLYCINE MAX* НА ЕЁ СВОЙСТВА**Л.А. Шапошников¹, А.А. Пометун^{1,2}, С.С. Савин¹, В.И. Тишков^{1,2}**¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия² ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

NAD(P) $\pm$ зависимая формиатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.2, ФДГ) впервые найдена в растениях, позже в бактериях, дрожжах, микроскопических грибах. Этот фермент играет важную физиологическую роль в различных организмах, например, в растениях является белком стресса, а в патогенных бактериях синтезируется при их переходе в состояние биоплёнки. ФДГ широко применяется в тонком органическом синтезе вместе с другими оксидоредуктазами в виде смесей ферментов, а также «сшитых» в одну полипептидную цепь. Роль ФДГ заключается в регенерации восстановленного кофермента NAD(P)H. Кроме того, ФДГ применяется в биоаналитических целях для определения формиата и NAD⁺ в различных биологических жидкостях [1].

Для успешного применения на практике необходимо, чтобы фермент обладал высокой каталитической эффективностью, был устойчивым к температурной и химической инактивации, а процесс получения и очистки фермента должен быть простым и быстрым. Наша лаборатория систематически изучает формиатдегидрогеназы из различных организмов уже много лет. Нами накоплен большой опыт по получению генетических конструкций, содержащих гены ФДГ, разработке методик экспрессии и эффективной очистке, а также сайт-направленному мутагенезу. Ранее нами было проведено клонирование ФДГ из сои *Glycine max* (SoyFDH), поскольку соя – это важная сельскохозяйственная культура, поэтому изучение её механизмов ответа на стрессовые условия является важной задачей. Данный фермент в сое имеет сигнальный пептид на N-конце, однако было показано, что при клонировании наличие сигнального пептида может вызвать появление телец включения. Поэтому данный ген был получен в двух формах: «длинной», соответствующей полноразмерному гену SoyFDH без сигнального пептида на N-конце, а также «короткой», аналогичной по своей последовательности N-конца гену ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101.

Для облегчения и ускорения выделения и очистки ферментов в их ген часто добавляют последовательность, кодирующую шесть остатков гистидина (His-tag, гистаг). Нами были получены две новые конструкции: с добавлением гистага на N-конец «длинной» формы и «короткой» формы. Показано, что наличие гистага снижает уровень экспрессии обеих форм в клетках *E.coli*, а также, что «длинная» форма имеет больший уровень экспрессии, чем короткая. Помимо этого, были изучены основные свойства полученных ферментов – кинетические параметры и температурная стабильность.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Москвы в рамках научного проекта No 21–34–70046 мол_а_мос.

1. Artiukhov A.V., Pometun A.A., Zubanova S.A., Tishkov V.I., Bunik V.I. Advantages of formate dehydrogenase reaction for efficient NAD⁺ quantification in biological samples. *Analytical Biochemistry*, 2020, v. 603, art 113797. DOI: 10.1016/j.ab.2020.113797.