

УДК 57.088.3

**СБОРКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ
ПРОБИОТИЧЕСКОГО ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА АМЕЛОГЕНИНА**

Савельева П.Д. (Университет ИТМО), **Отинов Г.Д.** (Университет ИТМО), **Серов К.В.**
(Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого),
Научный руководитель - к.б.н., доц. химико-биологического кластера
Кошель Е.И. (Университет ИТМО)

Аннотация. Зубной кариес является одним из наиболее широко распространенных заболеваний ротовой полости и, при отсутствии лечения, может привести к потере зуба. В процессе образования кариозной полости происходит разрушение зубной эмали человека, однако, для локального восстановления этих повреждений могут быть использованы генетически модифицированные микроорганизмы. В данной работе описывается дизайн и получение генетической конструкции, содержащей ген человеческого белка амелогенина, который является одним из основных факторов природного формирования плотной, упорядоченной структуры зубной эмали.

Введение. Зубная эмаль – это наиболее минерализованная и самая прочная ткань человеческого организма. Несмотря на этот факт, она не способна самостоятельно восстанавливаться после повреждений, так как клетки, участвующие в природном формировании эмали, – амелобласты погибают путем апоптоза после прорезывания зуба в ротовой полости. Основным внеклеточным белком, который синтезируется амелобластами в процессе их роста внутри десны, является амелогенин. Последовательность этого белка в организме человека кодируется геном *AMELX*. Ранее было показано, что рекомбинантный человеческий амелогенин может способствовать улучшению регенерации поддерживающих тканей зуба после таких заболеваний как кариес.

Цель. Основной целью исследования является разработка генетически модифицированного пробиотического штамма бактерии, способного экспрессировать человеческий амелогенин, для дальнейшего его применения при локальном восстановлении эмали.

Основная часть. Для сборки полной генетической конструкции, содержащей целевой ген, были рассчитаны и синтезированы 18 олигонуклеотидов длиной от 37 до 57 пар оснований (п.о.), содержащие в своей структуре области перекрытия в 10 – 30 п.о. с равной температурой плавления. При расчете последовательностей были использованы программы «DNAWorks (v3.2.4)» (National Institutes of Health, США) и «Vector-NTI Version 9» (Invitrogen, США). Была проведена сборка полной конструкции, состоящей из кодирующей последовательности гена, гистидинового тега, сайта узнавания TEV протеазы, сайтов рестрикции *Not I* и *Xba I*, а также стоп-кодона. Конструкт был собран с помощью двухэтапной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием высокоточной смеси полимераз Taq и Pfu (СибЭнзим, Россия). Полученный ампликон был клонирован в состав вектора pJET1.2 (ThermoFisher, США). Полученной конструкцией были трансформированы компетентные клетки *E. coli* DH5 α . Таким образом, были получены клоны, содержащие целевой ген, которые в дальнейшем послужат материалом для секвенирования по Сэнгеру и получения конструкции, не содержащей ошибок в нуклеотидной последовательности.

Выводы. На основе полученной генетической конструкции, в дальнейшем планируется разработка пробиотической бактерии – продуцента рекомбинантного амелогенина.