

Сурет 4 - *Rhodococcus* (3-2ГПД) штамының мембраналық фракциясының пероксидазды белсенділігіне аспирин әсері

Сонымен, Аспирин сезімтал *Arthrobacter* (4-1ГПД), *Mycobacterium* (8-2ГПД) штамдары арахинон қышқылының продуценттік көзі ретінде болуы мүмкін деп қорытындыланды.

- 1 Harrison K. Arachidonic acid's Molecule <http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=378#>
- 2 Kenichi Higashiyama, Shigeaki Fujikawa, Enoch Y. Park, Sakayu Shimizu. Production of Arachidonic Acid by *Mortierella* Fungi// *Biotechnol. Bioprocess Eng.*- 2002.-7: 252-262.
- 3 Давлетбаев И.М., Петухова Н.И., Зорин В.В. Скрининг низших грибов – потенциальных продуцентов незаменимых полиненасыщенных жирных кислот.// Башкирский химический журнал – 2000. –Т.7.-№5.-С.40-42.
- 4 Ерошин В.К., Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Желифонова В.П., Ботаст Р.Дж. Исследование синтеза арахиноновой кислоты грибами рода *Mortierella*: микробиологический метод селекции продуцентов арахиноновой кислоты // *Микробиология.* - 1996- Т. 65- №1.- С. 31-36.
- 5 Malkowski M.G., Ginell S.L., Smith W.L. and Garavito R.M. The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase // *Science.*-2002.-Vol.289.-p.1933-1937.
- 6 Варфоломеев С.Д., Мевх А.Т. Простагландины – молекулярные биорегуляторы. – М.: МГУ, 1985. – 308бет.
- 7 Vane J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 1971;231:232-5.

Экспериментальные исследования показали, что штаммы *Arthrobacter* (4-1ГПД) и *Mycobacterium* (8-2ГПД) могут быть продуцентами арахиноновой кислоты.

The experimental research shows that, the aspirin sensitive *Arthrobacter* (4-1ГПД) and *Mycobacterium* (8-2ГПД) strains are maybe source of arachidonic acid.

С.М. Тайпакова, А.Б. Жанаева, А.К. Бисенбаев
КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ КДНК ЭНДО-В-1,4-ГЛЮКАНАЗЫ ГРИБА
ASPERGILLUS NIGER В E. coli И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА
 (ДГП «Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии» КазНУ им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан)

Эндо-β-1,4-глюканаза (EG) является одним из ключевых ферментов целлюлазного комплекса, ответственного за гидролиз аморфных волокон целлюлозы. кДНК EG из гриба *Aspergillus niger* был клонирован в клетках *E. coli*. Методика клонирования включала получение и амплификацию кДНК гена с помощью ПЦР со специфическими праймерами. Продукт ПЦР был клонирован в векторной плазмиде *E. coli* под контролем промотора фага T7. Показана экспрессия гена *eng1* в клетках рекомбинантного штамма *E. coli*. Исследованы некоторые физико-химические свойства EG. Рекомбинантный белок обладал максимальной активностью при 50°C и pH 6.0.

В настоящее время основа процесса биоконверсии растительной биомассы состоит в ферментативном гидролизе целлюлозы до глюкозы с последующим сбраживанием ее в этанол или получении иных продуктов микробного синтеза [1]. Целлюлолитические ферменты применяются в форме мультиферментных композиций в составе премиксов к кормам животных и птиц для

деструкции не крахмальных полисахаридов. Целлюлазы также активно используются в качестве добавок к детергентам и моющим средствам. Кроме этого целлюлазы применяются для обработки текстильных изделий и материалов для биополировки трикотажа и изделий на основе хлопчатобумажных и смесовых тканей [2].

Широкое практическое применение целлюлолитических ферментов в определенной степени ограничивается их природой, поскольку целлюлазные препараты, полученные из природных штаммов, как известно, представляют собой комплекс различных ферментов, имеющих зачастую довольно низкие специфические активности. Кроме того, при реальном применении целлюлаз зачастую возникает необходимость использования больших количеств фермента, чтобы достичь желаемого результата. Продуктивность же природных штаммов целлюлолитических грибов и бактерий, во многих случаях, слишком мала для промышленного получения целлюлаз.

В связи с этим клонирование генов, кодирующих целлюлазы и повышение экспрессии их генов с использованием сильных и регулируемых промоторов, а также изучение свойств целлюлолитических и сопутствующих им ферментов, является задачей, имеющей большое научное и практическое значение.

Глубокая деструкция целлюлозы с образованием растворимых сахаров осуществляется под действием полиферментной системы целлюлаз, включающей в себя эндо-1,4- β -глюконазы (КФ 3.2.1.4), экзо-1,4- β -глюконазы (КФ 3.2.1.91), экзо-1,4- β -глюкозидазы (КФ 3.2.1.74) и целлобиазы (КФ 3.2.1.21). Свойства индивидуальных ферментов, а также их взаимодействие в составе целлюлазного комплекса определяют его эффективность при гидролизе целлюлозосодержащих субстратов [3].

Эндо-1,4- β -глюкоканазам пренадлежит важнейшая роль в действии полиферментных систем. Они первыми атакуют целлюлозу, гидролизуя внутренние β -1,4-гликозидные связи, удаленные от концов полимерной цепи целлюлозы (а так же лихенина, β -глюкана злаков, карбоксиметилцеллюлозы) с образованием целлоолигосахаридов и моно- ди- и трисахариды [1].

Ранее нами выделены кДНК гены целлобиогидролазы I и целлобиогидролазы II гриба *L. edodes* с применением реакции обратной транскрипции (РОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Методом тандемной масс-спектрометрии с последующим поиском в белковых базах данных установлено принадлежность рекомбинантных белков 7-й и 6-й семействам гликозид-гидролаз. Показана экспрессия генов целлобиогидролаз CEL7A [4] и CEL6B [5] в клетках рекомбинантного штамма *E. coli*.

В настоящей работе мы предлагаем результаты клонирования и экспрессии гена *eng1* гриба *Aspergillus niger* в *E. coli*.

Материалы и методы

Материалы

Ферменты рестрикции, T4 ДНК-лигаза и Tag ДНК-полимераза фирмы Fermentas Life Sciences (Германия). Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора High Pure Plasmid Isolation Kit, фрагменты ДНК очищали набором Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche Diagnostics GmbH, Германия). Все другие химические вещества и реактивы были аналитически чистыми и поставлены Sigma-Aldrich Corp (США). Для экспрессии использовали вектор pET11d (Invitrogen, США). Штамм *E. coli* DH5a использовали для наработки плазмиды. Штамм *E. coli* Rosetta (DE3) (Invitrogen, США) использован для экспрессии рекомбинантной EG.

Получение и амплификация кДНК гена с помощью ПЦР

Разработку олигонуклеотидных праймеров для амплификации гена проводили на основе данных о первичной структуре кДНК *eng1* гриба *Aspergillus niger*, имеющихся в электронной базе данных GenBank (GenBank регистрационный номер AF331518) [6]. Нуклеотидные последовательности этих праймеров приведены ниже: Dir 5'- CGCTCTAGATGAAGTTTCAGAGCACTC, Rev 5'- GACCGGATCCTCAAAGATATGC CTCCAGG. Подчеркнутые нуклеотиды соответствуют сайтам рестрикции XbaI и BamHI, соответственно.

Конструирование рекомбинантной плазмиды и экспрессия белка

Продукт ПЦР и вектор pET11d гидролизовали рестриктазами XbaI и BamHI по фланкирующим ген сайтам рестрикции при 37°C в соответствии с протоколом производителя. Продукты рестрикции лигировали с помощью T4-лигазы при 4°C в течение ночи. Далее рекомбинантный вектор pET11d/*eng1* был трансформирован в компетентные клетки *E. coli* Rosetta(DE3). Для переноса генетического материала использовался метод электропорации и ячейки фирмы Eurogentec на аппарате BioRAD Gene Pulser. Селекцию трансформантов проводили на чашках с LB в присутствии ампициллина. Несколько колоний, отобранных на селективной среде, в течении ночи выращивались в 20 мл LB-среды с

ампицилином в концентрации 200 мкг/мл при +37°C и 180 грм. Затем ночная культура вносилась в большой объем LB-среды (1 литр) с ампицилином (100 мкг/мл). При достижении культурой выращенной при температуре 30°C OD600 = 0.4-0.6, в среду был добавлен изопропил-тио-галактозид (ИПТГ) в конечной концентрации 0,2мМ для индукции экспрессии рекомбинантного гена. Сбор бактерий осуществляли центрифугированием при 6000xg в течение 7 мин при +4°C. Осажденные клетки ресуспендировали в буфере для хранения (20мМ HEPES pH-7,6 с 40 мМ NaCl) и лизировали соникированием в течение 20 секунд при мощности 14мА, до получения прозрачного лизата. Соникированная смесь центрифугировалась при 14 000xg в течение 10 мин для удаления клеточных остатков и надосадочная жидкость была использована в качестве источника рекомбинантного белка. О наличии индуцируемой экспрессии гена *eng1* судили с помощью ДСН-ПААГ электрофореза, иммуноблотинга и определения активности фермента.

Определение pH и температурных зависимостей активности белка

Ферментативную активность определяли с использованием карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) в качестве субстрата. Концентрацию восстанавливающих сахаров в растворе регистрировали спектрофотометрически методом Шомоди-Нельсона [7,8]. Определение pH-оптимума активности ферментов проводили измерением ферментативной активности в диапазоне значений pH от 4 до 9, с шагом 1 единиц pH. Для определения pH зависимости были использованы: натрий ацетатный буфер pH 4-6, натрий фосфатный буфер pH 7-8 и глицинный буфер pH 9. Изучение зависимости активности ферментов от температуры проводили измерением ферментативной активности при различных значениях температуры в диапазоне 30-70°C в pH-оптимуме действия ферментов. Результаты измерений отображали в единицах ферментативной активности. За единицу активности целлюбиогидролазы принимали количество фермента, которое образует 1 мкМ восстанавливающих сахаров за 1 мин на 1 мг тотального белка.

Содержание белка в образцах определяли по методу Бредфорда, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (БСА) [9].

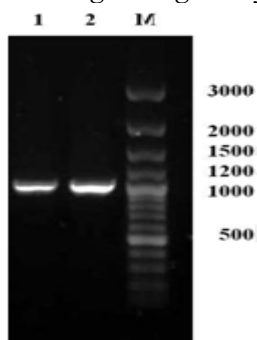
Для спектрофотометрических измерений использовали спектрофотометры PD-303UV фирмы «Arel».

Результаты и обсуждения

Для выделения гена кодирующей EG нами были сконструированы две олигонуклеотидных праймера на основе данных о первичной структуре кДНК *eng1 A. niger*, имеющихся в электронной базе данных GenBank (GenBank регистрационный номер AF331518) [6]. С помощью ПЦР со специфическими праймерами на матрице рекомбинантной плазмиды YEpGAP/*eng1* любезно предоставленной коллегами с Киотского университета (Kyoto University, Kitasiragawa, Kyoto, Japan) был амплифицирован один фрагмент ДНК размером около 1000 п.н. (рис. 1).

ПЦР-продукт обрабатывали рестриктазами *XbaI* и *BamHI* по фланкирующим ген рестриктным сайтам и клонировали в обработанный теми же рестриктазами вектор pET11d, который обладает необходимыми для экспрессии генов сильным, *lac* индуцибельным, селективным промотором бактериофага T7. Продукты рестрикции векторной ДНК и кДНК гена *eng1* лигировали с помощью лигазы фага T4. Полученный рекомбинантный вектор - pET11d/*eng1* - трансформировали в *E.coli*. Клоны были секвенированы в обоих направлениях.

Секвенирование нуклеотидной последовательности клонированного гена *eng1* показало полное совпадение с нуклеотидной последовательностью *eng1 A.niger* опубликованной ранее [6].



М: ДНК маркер (п.н.); 1,2- ПЦР-продукты кДНК гена *eng1*

Рисунок 1- Электрофорез продукта ПЦР

Поиск белков, гомологичных изучаемой эндоглюканазе, на основе транслированной нуклеотидной последовательности с помощью BLAST на веб-сайте NCBI, показал, что клонированный

кДНК ген *eng1* относится к 5А семейству гликозид-гидролаз. Гомологи EG найденные путем выравнивания аминокислотных последовательностей белка с ферментами, для которых известны их первичные структуры приведены в таблице 1.

Как видно из данных, представленных в таблице 1, аминокислотная последовательность транслированная на основе нуклеотидной последовательности клонированного нами гена *eng1* показывает высокую степень гомологии к известным грибным целлюлазам, относящимся к 5А семейству гликозид-гидролаз.

Эти данные указывают на высокую степень гомологии аминокислотной последовательности клонированного нами гена *eng1* известным грибным эндоглюконазам, относящимся к 5А семейству гликозид-гидролаз. Она на 99% идентична эндоглюканазе В гриба *Aspergillus kawachii*, на 80 % - целлюлазе *Neosartorya fischeri* NRRL 181 и 74 % идентичность наблюдается эндоглюканазе *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus*.

Таблица 1

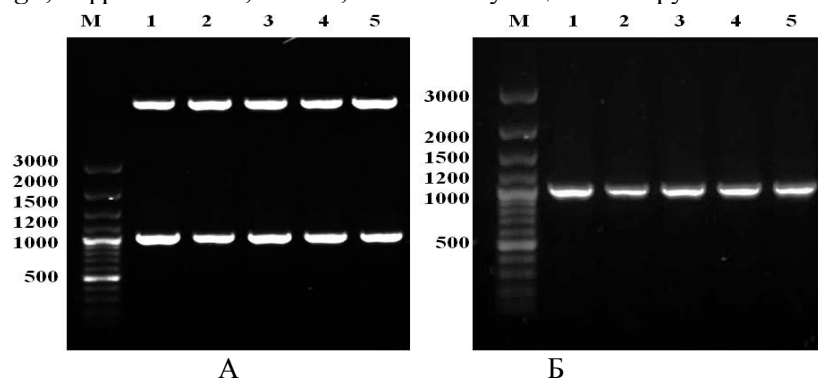
Значения blastp анализа для *eng1* кДНК гриба гриба *A.niger*

Регистрационный номер Genbank	Организм и ген	Score	E-value	Идентичность (%)
Q96WQ8	Endo-beta-1,4-glucanase B <i>Aspergillus kawachii</i>	626	0.0	99%
<u>XP_001257866.1</u>	Cellulase <i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	<u>491</u>	6e-170	80%
<u>AAL88714.2</u>	Endo-beta-1,4-glucanase <i>Thermoascus aurantiacus</i>	446	6e-151	74%
<u>AAL33630.2</u>	Endoglucanase <i>Talaromyces emersonii</i>	<u>415</u>	5e-140	68%

Для подтверждения того, что ген *eng1*, кодирует эндоглюканазу, мы использовали экспрессионный штамм *E.coli*. Rosetta (DE3). Штаммы *E.coli* Rosetta (DE3) созданы на основе штамма BL21 lacZY для увеличения экспрессии эукариотических белков, содержащих редко используемые *E. coli* кодоны. Эти штаммы содержат гены тРНК к следующим кодоном: AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA в устойчивых к хлорамфениколу плаزمидях.

Трансформация компетентных клеток *E.coli* продуктом лигирования вектора pET11d и ампликона *eng1* гена *A. niger* дала более 38 колоний, среди которых 8 отдельных клонов были отобраны. Все выбранные колонии были проанализированы с помощью ПЦР и рестрикционного анализов на наличие рекомбинантных плазмид, несущих ген *eng1*.

Плазмидная ДНК была выделена и очищена в соответствии с протоколом набора High Pure Plasmid Isolation Kit и обрабатывалась рестрицирующими эндонуклеазами *XbaI* и *VamHI*. Продукты рестрикции ДНК анализировали электрофорезом в 0,8% агарозном геле. Из рисунка 2А видно, что при рестрикции эндонуклеазами выщепляются фрагмент с длиной приблизительно 1 т.п.н., что соответствует длине *eng1*, и фрагмент в 5,7 т.п.н., соответствующий вектору.



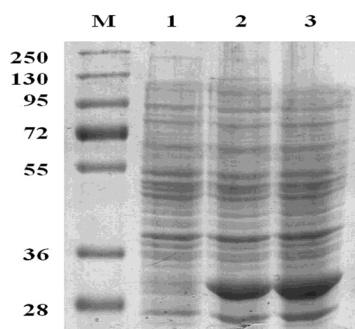
А - Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды pET11d/ *eng1*; Б - ПЦР анализ рекомбинантной плазмиды pET11d/ *eng1*; М: ДНК маркер; 1-4 клоны.

Рисунок 2- Анализ клонов трансформированных pET11d/*eng1* штаммов *E.coli* на наличие рекомбинантной плазмиды

С использованием ген специфических праймеров нами были проведены ПЦР анализ плазмидных ДНК, выделенных из трансформантов. Фрагмент, обнаруженный в результате агарозного гель-электрофореза по длине соответствовала клонированному гену *eng1* (рис. 2В), что указывает на то, что проанализированные колонии содержат плазмиды несущие соответствующий ген. В результате отбора мы идентифицировали пять клонов, несущих рекомбинантную плазмиду.

Экспрессию гена *eng1* в трансформированных клетках выявляли с помощью ДСН-ПААГ электрофореза, а также путем определения активности фермента.

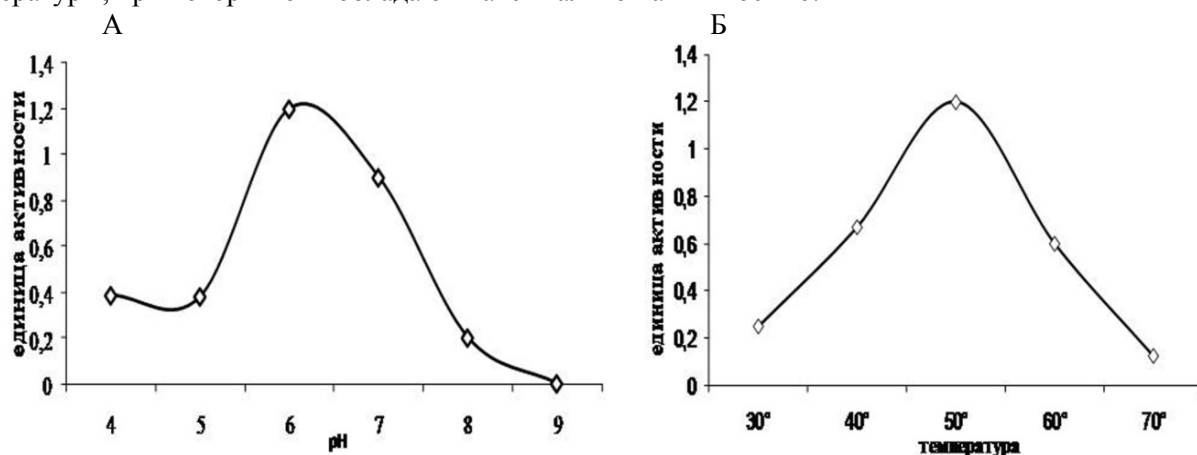
После индукции в присутствии ИПТГ в течение 4-12 часов клетки лизировали и белковые образцы были приготовлены для ДСН-ПААГ электрофореза, кипячением в 2х образцовом буфере. Данные ДСН-ПААГ электрофореза показали белковые полосы с молекулярной массой 30 кДа. Аналогичная белковая полоса не обнаруживалась в экстрактах клеток, несущих рЕТ11d без вставки (рис. 3).



М – Маркер; 1 – клеточный экстракт *E. coli* несущий пустой вектор рЕТ11d; 2-3- клеточный экстракт *E. coli* несущий рЕТ11d/*eng1* после 12 h инд. с ИПТГ

Рисунок 3- Экспрессия кДНК гена EG гриба *A. niger* в *E. coli*

Известно, что для большинства известных в настоящее время ферментов определен оптимум pH и температуры, при которых они обладают максимальной активностью.



Примечание: А - pH оптимум был определен при разных значениях pH (натрий ацетатный буфер (pH 4-6), натрий фосфатный буфер (pH 6-7) и глициновый буфер (pH 9)); Б - Температурный оптимум был определен в буфере с оптимальным значением pH.

Рисунок 4 - Влияние pH и температуры на активность рекомбинантного белка EG

Определение зависимости активности фермента от pH реакционной смеси проводили с использованием КМЦ качестве субстрата. Для этого экстракт *E. coli* несущий рЕТ11d/*eng1* после 12 ч индукции с ИПТГ инкубировали при 50 °С в течение 1 ч при различных pH. Результаты исследования показали, что рекомбинантный фермент проявляет оптимальную активность при pH 6. При этом необходимо отметить, что значительная активность сохранялась и при высоких значениях pH (рисунок 4А).

Температурный оптимум этого фермента определяли путем инкубации реакционной смеси в 0,05М фосфатного буфера натрия (pH 6,0) в течение 1 ч при различных температурах (30-70 °С).

Результаты исследования показали, что рекомбинантный фермент проявляет оптимальную активность при 50 °С (рисунок 4В).

1. Сеницын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. МГУ, 1995.

2. Эрнст Л., Лаптев Г. Ферменты улучшают переваривание клетчатки // Животноводство России. -2006. -№10. -С. 36-38.

3. Miyamoto K. Renewable biological systems for alternative sustainable energy production // Food & Agriculture Org., -1997. 108p.

4. Taipakova S.M., Smailov B.B., Stanbekova G., Bissenbaev A. K. Cloning and expression of *Lentinula edodes* cellobiohydrolase gene in *E. coli* and characterization of recombinant enzyme // Journal of Cell and Molecular biology.-Turkey, 2011. -Vol. 9. -№1. -P.53-63.

5. Taipakova S.M., Stanbekova G., Ischenko A., Saparbaev M., Bissenbaev A.K Cloning and expression of *Lentinula edodes* cellobiohydrolase CEL6B gene in *E. coli* // International Journal of chemistry and biology. -2011. -№1.-С.19-26.

6. Hon J., Tamaki H., Akiba S., Yamamoto K., Kumagai H. Cloning of Gene Encoding a Highly Stable Endo- β -1,4-Glucanase from *Aspergillus niger* and Its Expression in Yeast // J. BIOSCI. BIOENG.- 2001.- Vol. 92.-P. 434-441.

7. Nelson NJ. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose // *J Biol Chem.* -1944. -Vol.153. -P. 375-380.

8. Somogyi M. Notes on sugar determination // *J Biol Chem.* -1952. -Vol.195. -P. 19-23.

9. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding // *Anal Biochem.* -1976. -Vol.72. -P. 248-252.

EG enzymes are key components in fungal cellulase systems, and their functional activity is critical for hydrolysis of crystalline cellulose. The EG cDNA from *A.niger* was cloned into *E. coli*. The method of cloning consisted gene amplification with specific primers. The product of PCR was cloned into *E. coli* vector plasmid under control of T7 promoter. We showed expression of *eng1* gene in *E. coli* recombinant strain and examined some properties of the recombinant protein. It showed maximal activity at 50°C and pH 6.0

Эндо- β -1,4-глюканаза EGаморфты целлюлозаның гидролизіне жауапты целлюлазалық кешен ферменттерінің маңызды құрамдас бөлігі болып табылады. *Aspergillus niger* саңырауқұлағының EG қДНҚ молекуласы *E. coli* клеткасында клондалды. Клондау әдісі сайт спецификалық праймерлерді қолдану арқылы ПТР әдісі көмегімен қДНҚ молекуласын амплификациялау арқылы жүзеге асырылды. ПТР өнімі Т7 фагы промоторы бақылауында рЕТ11d векторында клондалды. *E. Coli* клеткасының рекомбинантты штаммында *eng1* генінің экспрессиясы көрсетілді. ENG1-ның кейбір физико-химиялық қасиеттері зерттелді. Рекомбинантты белок 50°С және рН6.0 максималды белсенділік көрсететіні анықталды.

**Л.П. Треножникова, С.А. Айткельдиева, А.Х. Хасенова, С.Ш. Шакиев, Г.Д. Ултанбекова,
А.К.Саданов**

ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В КАЗАХСТАНЕ

(Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК)

В работе изучены антагонистические свойства актиномицетов из солончаковых почв Алматинской области в нейтральных, соленых и щелочных условиях жизнедеятельности продуцентов.

В течение долгого периода ученые изучали разнообразие микроорганизмов в наиболее привычной нейтральной среде, а также, их выделение, исследование их свойств и образование ими природных биологически активных веществ было связано с нейтральными условиями. С нейтральными условиями связано и открытие современных природных антибиотиков, широко используемых в медицине для лечения инфекций различных этиологий. Однако разнообразие природной среды на нашей планете дает возможность предположить существование иных типов взаимоотношений в экстремальных местообитаниях микроорганизмов. Широкое распространение резистентных возбудителей инфекций, «открытие» уже известных антибиотических веществ, заставляет расширять границы скрининга, меняя его методы и источники получения новых перспективных биологически активных веществ. Поэтому необычные природные субстраты, экстремальные экосистемы являются в настоящее время наиболее востребованными источниками исследования, именно из них можно ожидать выделения новых микроорганизмов с уникальными свойствами. Морская среда, почвы с высоким уровнем засоления и щелочности, активно исследуются