

УДК: 577.216.3, 577.218

Тастанова А.С., Акбасова А.Ж., Тайпакова С.М., Бисенбаев А.К.

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ КДНК ЭНДО-В-1,4-ГЛЮКОНАЗЫ ГРИБА *ASPERGILLUS NIGER* В *E. COLI*

(ДГП «Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии»
КазНУ им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан)

Проведена амплификация кДНК эндоглюконазы гриба *Aspergillus niger* IFO31125 помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Ген клонирован под контролем регулируемого промотора фага T7 вектора pET11d и трансформирован в компетентных клетках *E. coli* Rosetta (DE3). Экспрессия гена *eng1* был показан с помощью ДСН-ПААГ электрофореза и определения ферментативной активности. Рекомбинантный фермент проявляет оптимальную активность при pH 6. Оптимальная температура фермента 50 °C.

Целлюлоза является основной составной частью клеточной стенки растений и одним из наиболее распространенных органических соединений в биосфере [1, 2]. Ферментативный гидролиз целлюлозы осуществляется комплексом четырех типов ферментов: 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 целлюбиазы (КФ 3.2.1.21). Вместе они известны как целлюлазы и действуют синергично, способствуя полному разрушению β-1,4-гликозидных связей целлюлозы [3].

Эндоглюконазам принадлежит важнейшая роль в действии полиферментных систем, поскольку они первыми атакуют целлюлозу. Гидролиз гликозидных связей эндоглюконазами протекает с сохранением конфигурации расщепляемой связи и может сопровождаться трансгликозилированием [4].

В настоящей работе нами клонирован и секвенирован ген эндоглюконазы гриба *Aspergillus niger* IFO31125.

В качестве матрицы для амплификации кДНК использовали рекомбинантную плазмиду YEpGAP/*eng1* любезно предоставленную коллегами с Киотского университета (*Kyoto University, Kitasiragawa, Kyoto, Japan*). Полимеразную цепную реакцию проводили с помощью сайт специфических праймеров Dir 5'-CGCTCTAGATGAAGTTTCAGAGCACTC, Rev 5'-GACCGGATCCTCAAAGATATGCCTCCAGG. Подчеркнутые нуклеотиды соответствуют сайтам рестрикции XbaI и BamHI, соответственно. Разработку олигонуклеотидных праймеров для амплификации гена проводили на основе данных о первичной структуре кДНК *eng1 A.niger*, имеющихся в электронной базе данных GenBank (GenBank регистрационный номер AF331518). С помощью ПЦР со специфическими праймерами был амплифицирован один фрагмент ДНК размером около 998 п.н. ПЦР-продукты обрабатывали рестриктазами XbaI и BamHI по фланкирующим ген рестриктным сайтам и клонировали в плазмиду pET11d обработанную теми же рестриктазами. Продукты гидролиза рестриктазами векторной ДНК и кДНК гена *eng1* лигировали с помощью T4 лигазы. Полученный таким образом рекомбинантный вектор - pET11d/*eng1* трансформировали в компетентные клетки *E. coli* Rosetta (DE3). Штамм *E. coli* Rosetta (DE3) создан на основе штамма BL21 lacZY для увеличения экспрессии эукариотических белков содержащих редко используемые в *E. coli* кодоны. Эти штаммы содержат гены tРНК к следующим кодонам: AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA в устойчивых к хлорамфениколу в плаزمидях.

После трансформации компетентных клеток *E. coli* было получено более 38 колоний, из которых было отобрано 5 индивидуальных клонов. Все отобранные колонии были исследованы на наличие в них рекомбинантных плазмид, содержащих в своем составе ген *eng1* с помощью рестрикционного и ПЦР анализа. В результате скрининга удалось идентифицировать 4 колоний, содержащих рекомбинантные плазмиды. Клоны были секвенированы в обоих направлениях. Определение нуклеотидной последовательности показал полное соответствие первичной структуры гена ранее опубликованной нуклеотидной последовательности гена *eng1 A. niger* [2].

Для того чтобы подтвердить, что ген *eng1* кодирует эндоглюконазу мы использовали экспрессионный штамм *E. coli* Rosetta (DE3).

Экспрессию гена *eng1* исследовали с помощью ДСН-ПААГ электрофореза и определения ферментативной активности. По результатам ДСН-ПААГ электрофореза удалось установить, что рекомбинантный штамм продуцирует белок с молекулярной массой 36.7 кДа, что находится в соответствии с молекулярной массой, предсказанной для ENG. Аналогичная белковая полоса не обнаруживалась в экстрактах клеток несущих pET11d без вставки.

Как описано выше эндоглюконазы эффективно гидролизуют внутренние гликозидные связи между моносахаридными остатками. Карбоксиметилцеллюлоза является самым подходящим субстратом для эффективной работы эндоглюконаз.

В связи с этим, определение зависимости активности фермента от pH реакционной смеси проводили с использованием карбоксиметилцеллюлозы (СМС) в качестве субстрата. Для этого экстракт *E. coli* несущий pET11d/*eng1* после 12 ч индукции с ИПТГ инкубировали при 50 °C в течение 1 ч при различных pH (натрий-ацетатный буфер (pH 4-6), натрий-фосфатный буфер (pH 6-7) и глициновый буфер (pH 9)). Результаты исследования показали, что рекомбинантный фермент проявляет оптимальную активность при pH 6.

Температурный оптимум этого фермента определяли путем инкубации реакционной смеси в 0,05М фосфатного буфера натрия (рН 6,0) в течение 1 ч при различных температурах (30-80 °С). Оптимальная температура фермента 50 °С.

Таким образом, ген кодирующий эндоглюконазу (EG) гриба *A.niger* клонирован и секвенирован. Ген впервые успешно экспрессирован под контролем регулируемого промотора фага Т7. Получены высокопродуктивные штаммы эндоглюконазы. Определены рН и температурные оптимумы рекомбинантного белка.

Литература

1 Murai T., Ueda M., Kawaguchi T., Arai M., Tanaka A. Assimilation of cellooligosaccharides by a cell surface-engineered yeast expressing beta -glucosidase and carboxymethylcellulase from *Aspergillus aculeatus* // *Appl Environ Microbiol*, 1998. – Vol.64. – P. 4857-4861.

2 Hong J., Tamaki H., Akiba S., Yamamoto K., Kumaga H. Cloning of a gene encoding a highly stable endo-β-1,4-glucanase from *Aspergillus niger* and Its expression in Yeast // *J. Biosci. Bioeng*, 2001. – Vol. 92(5). – P. 434-441.

3 Teeri T.T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases // *Trends in Biotechnology*, 1997. – Vol. 15. – P. 160-167.

4. Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов: Учебное пособие. - М.: Изд-во МГУ, 1995.

Тұжырым

EG аморфты целлюлозаның гидролизіне жауапты целлюлазалық кешен ферменттерінің маңызды құрамдас бөлігі болып табылады. *Aspergillus niger* IFO31125 саңырауқұлағының *eng1* қДНК молекуласы *E. coli* клеткасында клондалды. Клондау әдісі сайт спецификалық праймерлерді қолдану арқылы ПТР әдісі көмегімен қДНК молекуласын амплификациялау арқылы жүзеге асырылды. ПТР өнімі Т7 фагы промоторы бақылауында рЕТ11d векторында клондалды және *E. Coli* клеткасының рекомбинантты штаммында *eng1* генінің экспрессиясы көрсетілді.

Summary

EG enzymes are key components in fungal cellulase systems, and their functional activity is critical for hydrolysis of cellulose. A gene encoding endoglucanase was successfully cloned in *E. coli*. The method of cloning included amplification of cDNA using the gene specific primer by PCR. The PCR product was cloned into the vector pET11d plasmid under the control of T7 promoter. It was shown gene expression of *eng1* in recombinant strain of *E. coli*.

Торманов Н.

БОЛАШАҚ МАМАНДАРДЫҢ КӘСІБИ МӘДЕНИЕТТІЛІГІН ДАМУ (әл-Фараби атындағы ҚазҰУ биология факультеті, Алматы қ., Қазақстан)

Осы уақытқа дейін жоғары оқу орындарында биолог мамандарды дайындау олардың білімін дамытуға бағытталынған болатын. Заманауи талап бойынша болашақ биолог-мұғалім мамандарды дайындаудың мақсаты жоғары білімді, білікті мамандармен қатар, кәсіби мәдениетті ұстаздарды дайындауға басты назар аударылуға.

Жоғары оқу орындарында маман дайындауда, оның ішінде пән мұғалімдерін дайындаудағы басты екіпін студенттерге тек ғана білім беруді талап етіп келеді. Ал қазіргі таңда, негізгі акцентті басқа жаққа қарай бағыттаған жөн. Жоғары білім берудегі басты мақсат, көптеген ғалым-мамандардың зерттеуіне сүйенетін болсақ, болашақ мамандарды қалыптастыруда, дамытуда олардың кәсіби білімімен қатар мәдениеттілігін де дамыту, шығармашылық мәдениетіне ерекше мән беру.

Сондықтан да Республикамыздың білім беру саласының алдына қойылған басты мақсаты, болашақ мұғалімнің мәдени құндылығына бағдарлап, оның ішінде кәсіби мәдениеттілігін дамыту негізгі стратегиялық міндет болып есептеледі. Мұғалімнің кәсіби мәдениеті дегеніміз жалпы педагогикалық және пәндік білімі, біліктілігі, дағды, шеберлік құндылықтарын бағдарлау, сонымен қатар жеке тұлғалық сапасын арттыру.

Мұғалім ұрпақтан ұрпаққа білім беруді қамтамасыз ете отырып, Ұлттық мәдениетті сақтау арқылы, жаңа білім беру жүйесін қалыптастырып құру арқылы маманның мәдениеттілігін дамуына өз үлесін қосуда.

Мәдениетті маман тәрбиелеу үшін мыналарды басты бағдар етіп алу керек:

- сапалы, білімді, біліктілікті бола отырып жеке басының мінез құлқын және мәдени құндылығын рефлексифты тұрғыдан бағалау;

- болашақ мамандарға адамгершілік, рухани ізгілік жағына қарай бағыт-бағдар беру;

- кәсіби-мәдени нормаларды меңгере отырып, жеке тұлғалардың мәдениеттілікті қалыптастыру, мәдени құндылықты меңгеруге қатыстыра отырып, кәсіби мәдениетін дамытуға әртүрлі ақпараттарды пайдалана білуге үйрету;