

УДК 577.29;579.672;579.8.06;579.252.2

К.Г. Ли*, А.К. Молдагулова,
Э.Е. Бекенова, А.К. Кажыбаев, М.С. Уразова,
С.М. Шайхин, К.Х. Алмагамбетов

РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК, г. Астана, Казахстан
*e-mail:k.li@rcm.kz

Клонирование генов пептидогликангидролаз лактобацилл

Пептидогликангидролазы играют важную роль в делении клеток лактобацилл, и, вместе с тем, оказывают существенное влияние на иммунный статус колонизируемых ими организмов. Гены, кодирующие пептидогликангидролазы *Lactobacillus rhamnosus* GG *p40* и *p75* и их гомологи, представляют интерес как объекты клонирования с целью усиления их экспрессии в гомо- и гетерологичном окружении. Последовательности гомологов *p40* и *p75* из штаммов *Lactobacillus rhamnosus* BSR и *Lactobacillus casei* BI005 были обнаружены с помощью специфических праймеров, а продукты их амплификации клонированы в векторе pGEM®-T Easy. Полученные плазмидные конструкции будут использованы для дальнейших манипуляций по изучению экспрессии генов пептидогликангидролаз в клетках *E.coli*.

Ключевые слова: пептидогликангидролазы, клонирование, лактобациллы.

К.Г. Ли, А.К. Молдагулова, Э.Е. Бекенова, А.К. Кажыбаев,
М.С. Уразова, С.М. Шайхин, К.Х. Алмагамбетов

Лактобациллдердің пептидогликангидролаздардың гендерін клондау

Пептидогликангидролаздар лактобациллдердің клеткалардың бөлінуінде үлкен рөл ойнайды және олармен колонизирленетін организмдердің иммунды статусына маңызды әсер тигізеді. *Lactobacillus rhamnosus* GG *p40* және *p75* және олардың гомологтарының пептидогликангидролаздарын кодтайтын гендер клондау объектісі ретінде гомо- және гетерологиялық ортада олардың экспрессиясын күшейтетін мақсатта қызығушылықты танытады. *Lactobacillus rhamnosus* BSR және *Lactobacillus casei* BI005 штамдарынан *p40* и *p75* гомологтарының тізбектері ерекше праймерлермен анықталған, олардың амплификациясының өнімдерін pGEM®-T Easy векторында клондай. Алынған плазмидті құрылымдар *E.coli* жасушаларындағы пептидогликангидролаздарын болашақтағы гендердің экспрессиясының зерттелуінің манипуляциясы үшін жұмсалады.

Түйінді сөздер: пептидогликангидролазалар, клондау, лактобациллдер.

K.G. Li, A.K. Moldagulova, E.E. Bekenova, A.K. Kazybaev,
M.S. Urazova, S.M. Shajhin, K.H. Almagambetov

Cloning of lactobacilli peptidoglycan hydrolases genes

Peptidoglycanhydrolases play an important role in Lactobacilli cells division and at the same time, have a significant effect on the immune status of the colonized organisms. Genes encoding peptidoglycanhydrolases of *Lactobacillus rhamnosus* GG *p40* and *p75* and their homologues are the objects of interest for cloning to enhance their expression in the homo- and heterologous background. The sequences of *p40* and *p75* homologues from strains *Lactobacillus rhamnosus* BSR and *Lactobacillus casei* BI005 were found using specific primers, and products of their amplification were cloned into the pGEM-T vector. The resulting plasmid constructions will be used for further manipulations to study the peptidoglycanhydrolases genes expression in *E.coli* cells.

Keywords: peptidoglycan hydrolase, cloning, lactobacilli.

Геномы штаммов *Lactobacillus casei/para-casei* и *Lactobacillus rhamnosus* содержат два гена, кодирующие белки, гомологичные *p40* и

p75 из LGG. Последние проявляют антиапоптотический и защитные эффекты по отношению к эпителиальным клеткам кишечника че-

ловека и мыши [1]. Белки p40 и p75 содержат цистеин, гистидин-зависимый аминотрансфераза/пептидазный (CHAP) и NLPC/P60 домены, соответственно, которые характерны для белков с гидролазной активностью по отношению к клеточной стенке. В штамме *L. casei* BL23 оба белка секретируются в среду роста, а также обнаруживаются на бактериальной клеточной стенке [2,3]. Очищенные, слитые с глутатион-S-трансферазой (GST) ВБ, гомологичные p40 и p75 из LGG, гидролизовали цепи пептидогликана, экстрагированные из клеточных стенок *L. casei*. Оба слитых белка связывались с муцином, коллагеном и кишечными эпителиальными клетками и, подобно белку p40 из LGG, стимулировали фосфорилирование рецептора эпидермального фактора роста в кишечнике мышей *ex vivo* [3]. Эти результаты показывают, что внеклеточные белки, входящие в аппарат метаболизма клеточной стенки, группы близких бактерий *L. casei/paracasei* – *L. rhamnosus*, скорее всего, участвуют в пробиотических эффектах, описанных для этих бактерий [3]. Целью настоящей работы являлось клонирование генов, гомологичных p40 и p75 из LGG из генома *Lactobacillus rhamnosus* BSR и *Lactobacillus casei* BI005.

Материалы и методы

Источниками генов гомологичных p40 и p75 являлись штаммы *Lactobacillus rhamnosus* BSR и *Lactobacillus casei* BI005, изолированные из молочнокислых продуктов. Выделение геномной ДНК молочнокислых бактерий из чистых культур МКБ проводили с помощью набора Wizard Genomic DNA Purification Kit, следуя рекомендациям производителя (Promega Corporation, США).

Подбор праймеров для клонирования проводили с применением компьютерных программ NCBI Blast 2 и OligoCalc [4]. Для постановки ПЦР использовали реактивы фирмы “Fermentas”. Праймеры были синтезированы в лаборатории органического синтеза НЦБ РК. ПЦР проводили на амплификаторе i-Cycler iQ5 (“BioRad”, США). Изображение гелей получали на гелъдокументирующем устройстве GelDoc, (BioRad, США).

Оптимизация условий ПЦР с праймерами, последовательность которых была определена по литературным данным, заключалась в конкретизации параметров постановки реакций

(температура отжига праймеров, количество циклов амплификации, концентрация ионов магния, праймеров и ДНК-матрицы) [3,5].

Клонирование последовательностей ДНК, гомологичных генам p40 и p75 LGG осуществляли с помощью набора pGEM®-T Easy (Promega, USA), согласно инструкции фирмы-производителя.

Результаты и обсуждение

Подбор праймеров для клонирования генов гомологичных p40 и p75 in silico. Анализ баз данных портала NCBI по нуклеотидным последовательностям позволил нам выявить достаточно узкую нишу организмов, которые обладают последовательностями с гомологией к генам, кодирующим белки p40 и p75 модельного пробиотического штамма *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). Их круг ограничен представителями видов, относящихся к группе *L. casei*, (в нее входят виды *L. casei*, *L. paracasei* и *L. rhamnosus*) [6]. Последовательность гена p40 оказалась высококонсервативной и в пределах рода *Lactobacillus* варьировала в пределах 2%, в то время как ген p75 прерывался достаточно длинными (порядка сотен нуклеотидных пар) последовательностями, что имело результатом классификацию гена как «ген с неизвестной функцией». Поэтому для подбора праймеров были выбраны последовательности генов p40 и p75 модельных штаммов *L. rhamnosus* GG и *L. casei* BL23.

Прямые праймеры были выбраны из участков, следующих непосредственно за лидерными пептидами генов p40 и p75 пептидогликангидролаз. Обратные праймеры захватывают участки окончания кодирующей последовательности генов, включая стоп-кодона. Последовательности, выбранные в качестве праймеров, были модифицированы для фланкирования клонируемых генов сайтами рестрикции эндонуклеаз, как показано в таблице 4, для последующего субклонирования. Это снизило гомологию праймеров на 15-17% (Табл.1).

Отработка условий амплификации нуклеотидных последовательностей, гомологичных генам p40 и p75 из LGG. Путем варьирования условий были подобраны оптимальные параметры ПЦР, обеспечивающие максимальный выход продуктов амплификации и, в то же время, не приводящие к появлению продуктов неспеци-

ифического синтеза ($MgCl_2$ 4mM, праймеры – 15 pmol, ДНК-матрица – 100 нг, температура отжига для p40 – 52-54°C, для p75 – 56-58°C).

Аmplификацию проводили по следующей программе: 95°C – 2 мин, (95°C – 10 сек; 55°C – 30 сек; 72°C – 30 сек) x 30, 72°C – 10 мин.

Клонирование последовательностей, гомологичных p40 и p75 из LGG в клетках E. coli

Клонирование последовательностей, гомологичных генам p40 и p75 из *L. rhamnosus* BSR и

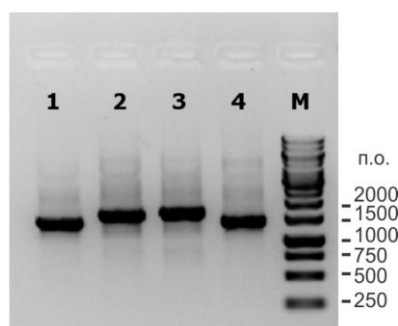
L. casei B005 имело целью получение конструкций для упрощенной процедуры их анализа и по последующего субклонирования для получения белковых продуктов. Процедура была выполнена согласно инструкции фирмы-изготовителя. Четыре целевые последовательности из *L. rhamnosus* BSR и *L. casei* B005 (гены, гомологичные генам p40 и p75 из LGG) были получены с помощью ПЦР-амплификации, как было описано выше.

Таблица 1 – Праймеры для клонирования генов p40 и p75

Наименование олигонуклеотида	Спецификация (последовательность 5' – 3')
BL23p40f	GTTGGATCCGATACAAGCGACAG
BL23p40r	GTGGGTACCTTACCGGTGGATATAA
BL23p75f	GTTGAATTCTCAACGGGGACA
BL23p75r	TAGGGTACCTTATAGTGAAGGACG
LGG p40f	TACCGTTTCGAATTCGACAGGGACGGTC
LGG p40r	GATCATTAAGCCTCGAGTGACGGGCGAAC
LGG p75f	ACCGGTTTTGAATCCACAAGTGCCAGC
LGG p75r	TAAGGGTGGGTAACCTCGAGCCGGTGGATG

Далее ампликоны инкубировали с *Taq*-полимеразой (**Thermo Scientific, EU**) в стандартных условиях с добавлением аденозинтрифосфата в концентрации 10mM для наращивания свободных 3'- липких А-концов. После очистки продуктов полимеразной реакции на микроколонках Centrisep (Princeton Separations, USA) их использовали в качестве фрагментов-вставок в линеаризованный вектор pGEM[®]-T в лигазной реакции (T4-ДНК-лигаза, 4°C, 16 часов).

Лигазная смесь использовалась непосредственно в высокоэффективной трансформации компетентных клеток *E. coli JM109*, осуществленной по общепринятой процедуре [7]. Отбор трансформантов осуществляли «бело-голубой» селекцией на чашках с LB-агаром, содержащим ампициллин (100 мкг/мл), X-gal (80 мкг/мл) и ИПТГ (0,5 мМ). Трансформированные колонии пересеивали на LB-агар с ампициллином (100 мкг/мл). Отдельные колонии трансформан-



1 – pGEM-T/1, 2 – pGEM-T/2, 3 – pGEM-T/3 и 4 – pGEM-T/4.
M – маркеры размера ДНК

Рисунок 1 – Продукты амплификации ПЦР положительных клонов с использованием праймеров M13

тов анализировали прямой ПЦР-реакцией. В результате были отобраны четыре плазмидные конструкции, несущие вставки генов пептидогликангидролаз (Рисунок 1).

Для идентификации рекомбинантных генов, клонированных в векторе pGEM[®]-T, вставки клонов секвенировали с использованием праймеров M13 и набора BigDye[®] Terminator Sequencing Kit 3.1 (Applied Biosystems, USA) согласно инструкции фирмы-производителя.

Результаты частичного секвенирования вставок подтвердили факт успешного клонирования генов, гомологичных *p40* и *p75* из LGG.

Таким образом, было осуществлено клонирование генов двух штаммов лактобацилл, гомологичных генам *p40* и *p75* из *L. rhamnosus* GG. Дальнейшее изучение их гетерологичной экспрессии в *E. coli* открывает возможности препаративной наработки рекомбинантных белков, гомологичных *p40* и *p75* из LGG и обладающих пептидогликангидролазной активностью.

Литература

- 1 Yan F., Cao H., Cover T.L., Whitehead R., Washington M.K., Polk D.B. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth // *Gastroenterology*. – 2007. – V. 132. – Issue 2. – P. 562 – 575.
- 2 Lebeer S., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C.J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2008. – V 72. – Issue 4. – P. 728–764.
- 3 Bäuerl C., Pérez-Martínez G., Yan F., Polk D.B., Monedero V. Functional analysis of the p40 and p75 proteins from *Lactobacillus casei* BL23 // *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. – 2010. – V.19. – P.231–241.
- 4 Kibbe W.A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator // *Nucl. Acids Res.* – 2007. – Vol. 35. –
- 5 Claes I.J.J., Schoofs G., Regulski K., Courtin P., Chapot-Chartier M., Rolain P., Hols P., von Ossowski I., Reunanen J., de Vos W.V., Palva A., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C.J., Lebeer S. Genetic and biochemical characterization of the cell wall hydrolase activity of the major secreted protein of *Lactobacillus rhamnosus* GG // *PLoS One*. – 2012. – V. 7. – Issue 2. – e31588.
- 6 Morita H., Toh H., Oshima K., Murakami M., Taylor T.D., Igimi S., Hattori M. Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 // *J. Bacteriol.* – 2009. – № 191 (24). – C. 7630-7631.
- 7 Green M., Sambrook J. *Molecular cloning. A laboratory manual* // Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 2012. – P. 2028.