

Тайпақова С.М.¹, Станбекова Г.², Бисенбаев А.Қ.¹, Ысқақов Б.Қ.²
***Lentinula edodes* САҢЫРАУҚҰЛАҒЫНЫҢ ТЕРМОТҰРАҚТЫ ЦЕЛЛОБИОГИДРОЛАЗА**
ГЕНДЕРІН СИПАТТАУ ЖӘНЕ АМПЛИФИКАЦИЯЛАУ

(¹Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті

Биология және биотехнология мәселелері ғылыми зерттеу институты

² ҚР БҒМ ҒК М.Ә.Айтқожин атындағы молекулалық биология және биохимия институты)

cel7A және cel6B гендерінің нуклеотидтік қатарының компьютерлік талдануы нәтижесінде олардың трансляция өнімдері ферменттердің 7A және 6B гликозил-гидролаза тұқымдасына жататындығы дәлелденді. Lentinula edodes саңырауқұлағының мицелиінен бөлініп алынған нуклеин қышқылы препаратынан кері транскрипция реакциясы және потимеразды тізбектік реакция көмегімен cel7A және cel6B гендерінің қДНҚ-сы амплификацияланды.

Целлюлозаның ферментативтік гидролизі нәтижесінде түзілген глюкозаның этанолға ашуы немесе микробтық синтездің басқа да өнімдерін алуда қолданылуы өсімдік биомассасының биоконверсиялануының негізін құрайды. Ағаш тектес өсімдіктер сонымен қатар, ауылшаруашылығындағы, ағаш өңдеу өндірісіндегі қалдықтар, тіпті тұрмыстық қатты қалдықтар әртүрлі химиялық өнімдер және био отын алу үшін арзан әрі қайта қалпына келетін шикізат көзі ретінде үлкен потенциалға ие. Осы шикізаттарды өндеудің құны және целлюлазалық кешеннің гидролитикалық әсерінің эффективтілігі лигноцеллюлозалық биомассаның биоконверсиялану процессінің рентабельділігіне әсер ететін негізгі факторлар болып табылады [1].

Целлюлоза – өзара β -1,4-D-глюкозидтік байланыстармен байланысқан глюкозадан тұратын ерімейтін полисахарид. Целлюлозаның ферменттік деструкциялануы жеке ферменттердің әсерінен емес целлюлазалық кешен атауымен белгілі эндо- β -1,4-глюканаза, экзо- β -1,4-глюканаза (целлобиогидролаза; СВН) және β -глюкозидаза ферменттер тобы әсерінен жүреді [2]. Бұл ферменттерге целлюлозаның байланыстарын толығымен ыдыратуға мүмкіндік беретін синергизмді әсер ету қасиеті тән [3]. Сонымен қатар олардың жеке қасиеттері және целлюлазалық кешендегі өзара әсерлесуі целлюлозалы субстраттардың гидролиздену процессіндегі кешеннің эффективтілігін анықтайды.

Әртүрлі типті целлобиогидролазалар (СВН) саны анықталған, алайда саңырауқұлақтарда термотұрақты бірегей түрлері ғана сипатталған. Бірнеше зерттеу жұмыстарының нәтижесі бойынша *Lentinula edodes* саңырауқұлағы қоректенуі үшін лигноцеллюлолитикалық субстраттарды ыдырата алатын термотұрақты целлюлолитикалық ферменттердің көзі [4].

Жұмыстың мақсаты *Lentinula edodes* саңырауқұлағының целлобиогидролаза гендерін сипаттау және амплификациялау болып табылады

Зерзаттары және әдістері

Нуклеин қышқылы препараттарын бөліп алу үшін материал ретінде *Lentinula edodes* саңырауқұлағының мицелиін қолдандық. Целлобиогидролаза гендерінің нуклеотидтік ретінің компьютерлік талдануы “MicroGenie”, «GeneRunner», «VNTI Viewer», «NetGene2» компьютерлік бағдарламалар көмегімен іске асырылды. Белоктардың аминқышқылдық реті де осы бағдарламалар бойынша талданды. Кері транскрипция реакциясы РНК-тәуелді ДНК-полимераза (M-MuLV-RT, фирмы «Fermentas») көмегімен және Полимераздық тізбектік реакция (ПТР) стандартты әдісі көмегімен орындалды. Целлобиогидролаза гені ендірілген генетикалық конструкция құруда гендік инженерия әдістері қолданылды.

Нәтижелер және оларды талдау

Біз шамамен 516 аминқышқылынан тұратын, молекулалық массасы 53,5 килодальтон (кДа) және изоэлектрлік нүктесі (ИЭН) орташа есеппен 4,1 болатын целлобиогидролаза I белогын кодтайтын 1571 ж.н. қамтитын (номер AF411250 GenBank) *cel7A* генінің мРНҚ-сының нуклеотидтік ретін компьютерлік талдадық. Компьютерлік талдау нәтижелері бойынша бұл фермент N-соңында, Gly18 және Gln19 аралығында кесілетін, сигналдық пептидінің болуына байланысты саңырауқұлақтар клеткасынан секрециялануы керек. *cel7A* генімен кодталатын белокта (CEL7A) ұзындығы 430 амин қышқылы қалдығынан тұратын (20-дан 449-ға дейінгі) каталиттік доменінің болуы, оны гликозил-гидролазаның 7-тұқымдасына жатқызуға мүмкіндік береді.

Сонымен қатар, шамамен 444 аминқышқылынан тұратын, молекулалық массасы 46,4 килодальтон (кДа) және изоэлектрлік нүктесі (ИЭН) орташа есеппен 4,1 болатын гликозил-гидролаза ферментін кодтайтын 1335 ж.н. қамтитын (номер AF411251 GenBank) *cel6B* генінің мРНҚ-сының нуклеотидтік ретін компьютерлік талдадық. Бұл белоктың (CEL6B) 103-тен 410-ға дейінгі амин

қышқылы қалдығынан тұратын каталиттік доменінің болуы, оны гликозил-гидролазаның 6-тұқымдасына классификациялауға мүмкіндік береді..

1	M FRTAALLSF AYLAVVYG*QQ AGTSTAETHP PLTWEQCTSG	40
41	GSCTTQSSSV VLDSNWRWTH VVGGYTNCYT GNEWNTTVCP	80
81	DGTTCAANCA LDGADYEGTY GISTSGNALT LKFVTASAQT	120
121	NVGSRVYLM A PGSETEYQMF NPLNQEFTFD VDVSAALPCGL	160
161	NGALYFSEMD ADGGLSEYPT NKAGAKYGTG YCDSQCPRDI	200
201	KFIEGKANVE GWTPSSTSPN AGTGGTGICC NEMDIWEANS	240
241	ISEALTPHPC TAQGGTACTG DSCSSPNSTA GICDQAGCDF	280
281	NSFRMGDTSF YGPGLTVDTT SKITVVTQFI TSDNTTTGDL	320
321	TAIRRIYVQN GQVIQNSMSN IAGVTPNEI TTDFCDQQKT	360
361	AFGDTNFTSE KGGLTGMGAA FSRGMVLVLS IWDDAAEML	400
401	LDSTYPVGKT GPAAARGTCA TTSGQPDQVE TQSPNAQVVF	440
441	SNIKFGAIGS TFSSTGTGTG TGTGTGTGTG TTTSSAPAA	480
481	QTKYGCQCGQ GWTGATVCAS GSTCTSSGPY YSQCL#	515

Бірінші аминқышқылы - метионин (**M**) қанық шрифтпен көрсетілсе, сигналдық пептидтің кесілу орны жұлдызшамен (*) көрсетілген. # - белгісімен стоп-кодон орны белгіленген.

Сурет 1- CEL7A целлобиогидролазаның аминқышқылдық реті

Компьютерлік талдау нәтижелері бойынша бұл фермент те CEL7A секілді N-соңында, Gly20 және Gln21 амин қышқылы қалдықтары аралығында кесілетін, сигналдық пептидінің болуына байланысты саңырауқұлақтар клеткасынан секрециялануы керек.

Целлобиогидролаза CEL6B, CEL7A амин қышқылдық ретін компьютерлік талдау арқылы cel7A генінің ашық оқу шегі (АОШ) метионинді (M) кодтайтын инициациялаушы AUG-кододынан басталып (#) стоп кодонмен аяқталатын 524 кодоннан, ал cel 6B гені үшін - 445 кодоннан тұратындығын анықтадық.

1	M KITSTGLLA LSSLLPFALG* QSQLYGQCGG IGWSGATTCV	40
41	SGATCTVVNA YYSQCLPGSA SAPPTSTSSI GTGTTTSSAP	80
81	GSTGTTTPAA GNPFTGYEIIY LSPYYANEIA AAVTQISDPT	120
121	TAAAAAKVAN IPTFIWLDQV AKVPDLGTYL ADASAKQKSE	160
161	GKNYLVQIVV YDLPDRDCAA LASNGEFTIA DNGEANYHDY	200
201	IDQIVAQIKQ YPDVHVVAVI EPDSLANLVT NLSVAKCANA	240
241	QTTYLECPTY AMQQLSAVGV TMYLDAGHAG WLGWPANLSP	280
281	AAQLFTSLYS NAGSPSGVRG LATNVANYNA LVATTPDPIT	320
321	QGDPNYDEML YIEALAPLLG SFPAHFIVDQ GRSGVQDIRQ	360
361	QWGDWCNVLG AGFGTQPTTN TGSSLIDSIV WVKPGGECDCG	400
401	TSNTSSPRYD AHCGLPDATP NAPEAGTWFO AYFETLVEKA	440
441	NPPL#	445

Бірінші аминқышқылы - метионин (**M**) қанық шрифтпен көрсетілсе, сигналдық пептидтің кесілу орны жұлдызшамен (*) көрсетілген. # - белгісімен стоп-кодон орны белгіленген.

Сурет 2 - CEL6B целлобиогидролазаның аминқышқылдық реті

cel7A және cel6B гендерінің мРНҚ (кДНҚ) нуклеотидтік ретін компьютерлік талдау арқылы *L. edodes* саңырауқұлағынан бөліп алынған РНҚ препараттары негізінде жоғарыда аталған гендерді кері транскрипция реакциясы (КТР) және полимеразды тізбектік реакция (ПТР) әдістері көмегімен амплификациялау үшін олигонуклеотидтік праймерлер есептеліп, синтезделіп алынды.

*Sma*I

cel 7A Rev: 5' -CTA**C|CCGGG**CTACAAACATTGACTGTAGTAAGG-3'

cel 7A Dir: 5' -GATCA**CCATGG**TCCGAACAGCAGCTCTCCTCT-3'

*Nco*I

*Sma*I

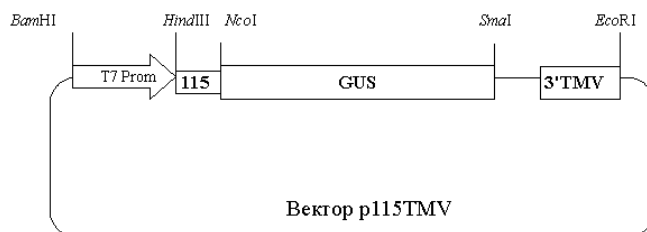
cel 6B Rev: 5' -CTA**C|CCGGG**STATAGAGGAGGGTTGGCCTTTT-3'

cel 6B Dir: 5' -GCTA**CCATGG**AGATTACTTCCACTGGCTTA-3'

*Nco*I

Сұр фонда қанық курсивпен *SmaI* рестрикциялаушы эндонуклеаза ферментінің рестрикциялық сайты, ал күңгірт фонда *NcoI* рестриктаза ферментінің рестрикциялық сайты көрсетілген.

Молекулалық клондау әдістерін қолдану арқылы әртүрлі гендерді клеткасыз жүйеде және прокариоттар клеткасында клондауға мүмкіндік беретін реттеуші элементтерден тұратын кассеталы плазмидалық векторларды құрастырдық (сурет 3). Бұл вектор бұрын синтезделген басқа рекомбинантты конструкциялардан мРНҚ-ның 5'- және 3'-трансляцияланбайтын тізбектерінде локализацияланған трансляциялық энхансерлерінің (күшейткіштер) болуымен ерекшеленеді [5,6].

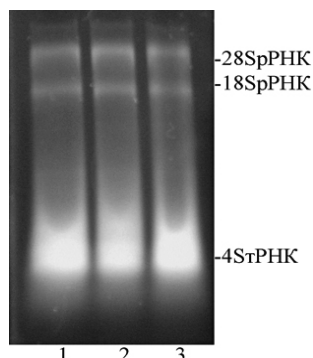


Шамамен 5300 жұп нуклеотидтен тұратын вектор *p-115-TMV* құрамына *T7* бактериофагының промоторы (*T7*), синтетикалық тізбек (*115*), β -глюкуронидаза гені (*GUS*) және темекі мозайкасы вирусының 3'-трансляцияланбайтын тізбегі (*3'TMV*) кіреді.

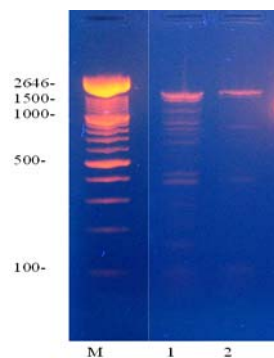
Сурет 3 - *p115TMV* векторының схемалық кескіні

3-суретте келтірілген векторда кезкелген геннің белок кодтаушы реті β -глюкуронидаза (*GUS*) репортерлік белогын кодтайтын нуклеотидтік тізбекті кесіп, ДНҚ сегментін алып тастағаннан кейін *NcoI* және *SmaI* рестрикциялық ферменттерінің рестрикциялық сайттары аралығында клондалуы мүмкін.

Біз жұмыс барысында *Lentinula edodes* (Шиитаки) саңырауқұлағы мицелиінен нуклеин қышқылы препаратын бөліп алдық.

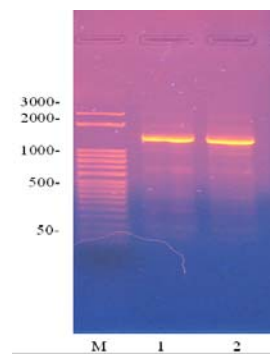


1-3 - *L.edodes* мицелиінен бөлініп алынған нуклеин қышқылы препараты; Сол жағында 28S рРНҚ, 18S рРНҚ, и тРНҚ (4S) орналасуы көрсетілген.



М-маркерлік ДНҚ фрагменттері (100 ж.н.); 1-2 - КТ-ПТР өнімдері

А-*cel7A* қДНҚ амплификациясы Б - *cel6B* қДНҚ амплификациясы



Сурет 4 - *L.edodes* мицелиінен бөлініп алынған нуклеин қышқылының тотальдік препараты

Сурет 5 – Целлобиогидролаза қДНҚ гендерінің амплификациясы

4-суретте көрсетілгендей нуклеин қышқылы препаратының негізгі компоненттері 28S және 18S рибосомалық РНҚ, сонымен қатар, транспорттық РНҚ (4S, шамамен 100 нуклеотид) болып табылады. РНҚ препаратын қосымша түрде 3M LiCl –мен тұнбаға түсіру арқылы төмен молекулалы тРНҚ супернатантта қалып, препарат азды-көпті жоғарымолекулалы компоненттермен байытылды. Бұл препарат ПТР әдісі көмегімен *cel 6B*, *cel7A* геномдық ДНҚ-сын алуда қолданылды.

Тотальді РНҚ препараты негізінде қДНҚ синтездеу іске аспағандықтан, мРНҚ-ның олиго-dT целлюлозада *poli-A* байытып, кері транскрипция реакциясы (КТР) әдісі көмегімен *cel6B*, *cel7A* гендерінің қДНҚ молекуласын синтездедік және КТР өнімін полимеразды тізбектік реакция (ПТР)

әдісі арқылы амплификациялады. ПТР реакциясы үшін жоғарыда көрсетілген олигонуклеотидтік праймерлер қолданылды.

5 - суреттен расында да мөлшері шамамен 1571 ж.н. тұратын cel7A кДНК-ға және 1335 ж.н. тұратын cel6B кДНК-ға сәйкес келетін амплификация өнімдері алынғанын көруге болады.

Целлобиогидролаза ферментінің cel7A және cel6B кДНК-сының нуклеотидтік қатарын компьютерлік талдау нәтижесінде олардың трансляция өнімдері 7A және 6B гликозил-гидролазала тұқымдасына жататындығы дәлелденді. Целлобиогидролаза белоктарының аминқышқылдық ретін талдау олардың нативтік сигналдық пептидінің болуына байланысты саңырауқұлақ клеткасынан секрециялатындығын анықтады. кДНК-ны клондау үшін оптимальді вектор таңдап алынып, рекомбинантты кассеталық конструкциясы компьютерлік моделденді. *Lentinula edodes* саңырауқұлағының нуклеин қышқылы препараты бөлініп алынып, КТР және ПТР әдістері көмегімен cel7A және cel6B гендерінің кДНК-сы амплификацияланды. кДНК амплификациясының өнімдерінің электрофорездік анализі жасалынды.

Әдебиеттер

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

2 М.Л. Рабинович, М.С. Мельник. Прогресс в изучении целлюлолитических ферментов и биодegradация высокоупорядоченных форм целлюлозы. Успехи биологической химии, т. 40, с. 205-266

3 Johnson, E. A. 1983. Regulation of cellulase activity and synthesis in *Clostridium thermocellum*. Ph.D. thesis. Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Mass.

4 Charles C Lee, Dominic W.S. Wong, George H Robertson (2001) Cloning and characterization of two cellulase genes from *Lentinula edodes* FEMS Microbiology Letters 205 (2), 355–360. doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10972.x

5 Bayer, E. A., E. Morag, and R. Lamed. 1994. The cellulosome – a treasure trove for biotechnology. Trends Biotechnol. 12:379–386.

6 Bayer, E. A., E. Morag, Y. Shoham, J. Tormo, and R. Lamed. 1996. The cellulosome: a cell surface organelle for the adhesion to and degradation of cellulose, p. 155–182. In M. Fletcher (ed.), Bacterial adhesion: molecular and ecological diversity. Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y.

Резюме

В результате компьютерного анализа нуклеотидной последовательности cel7A и cel6B кДНК было доказано что продукты их трансляции относятся к 7A и 6B гликозил-гидролазному семейству ферментов. Были амплифицированы cel7A и cel6B кДНК с применением реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции из препарата нуклеиновых кислот выделенного из мицелиев гриба и *Lentinula edodes*.

Resume

By using a RT-PCR strategy two cellulase cel7A and cel6B cDNA genes from Shiitake mushroom *Lentinula edodes* were amplified. It has been shown that products of their translation belonged to glycosyl hydrolase family 7 and 6 and had sequence similarities to cbhII genes from other fungi.

УДК 577.21:633.1

Е.К. Турусбеков

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ ЛОКУСОВ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ГЕНОМА ЯЧМЕНЯ, ДЕТЕРМИНИРУЮЩИХ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТЬ

(Институт биологии и биотехнологии растений НЦБ КН МОН РК)

Проведен PCR анализ родительских форм экспериментальной картирующей популяции – сорта Южно Казахстанский 43 (ЮК43) и линии дикорастущего ячменя *H.spontaneum* К. (*H.sp*) из Израиля с использованием 45 комбинаций AFLP и 57 пар SSR-праймеров с целью идентификации полиморфных маркеров для построения групп сцепления ячменя. Построена генетическая карта ячменя ЮК43 x *H.sp* с использованием 17 SSR и 50 AFLP маркеров. Осуществлен анализ структуры урожая и физиологобиохимические тесты родительских форм и 114 линий экспериментальной популяции ЮК43 x *H.sp*. Использование генетической карты генома ячменя и статистических прикладных программ ANOVA и QTL Cartographer позволило выявить 12 QTL, детерминирующих показатели, ассоциированные с засухоустойчивостью. Обнаружено 5 ДНК маркеров, тесно сцепленных с идентифицированными QTL, ассоциированными с засухоустойчивостью.