Доклады Национальной академии наук Беларуси

2015 **январь–февраль** **Том 59 № 1**

УДК 577.2+579.22+577.15

А. А. КОСТЕНЕВИЧ, Л. И. САПУНОВА, академик А. Г. ЛОБАНОК

КЛОНИРОВАНИЕ И СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО β-ГАЛАКТОЗИДАЗУ БАКТЕРИЙ *ARTHROBACTER SULFONIVORANS*

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск *Поступило 29.10.2014*

Введение. β-Галактозидазу (лактазу, β-галактозид-галактогидролазу, КФ 3.2.1.23) синтезируют организмы различной таксономической принадлежности [1], однако широкое коммерческое применение находят лишь ферменты микробного происхождения. β-Галактозидаза катализирует реакцию гидролиза лактозы и используется в виде препаратов различной степени очистки или в составе клеток микроорганизмов-продуцентов для производства лекарственных средств, компенсирующих лактазную недостаточность, для получения из молока и отходов его переработки безлактозных продуктов питания и кормов, для синтеза лактулозы и других галактоолигосахаридов пребиотического действия, в диагностических целях [2–5].

Хотя β-галактозидазы микроорганизмов, в том числе бактерий, хорошо изучены, практически отсутствуют данные о природе множественных молекулярных форм у бактерий рода *Arthrobacter* [6].

Ранее нами был отобран [7] и идентифицирован [8] продуцент внеклеточной β-галактозидазы – штамм бактерий *Arthrobacter sulfonivorans* БИМ В-2242. Способ получения β-галактозидазы на основе адаптированного к лактозе штамма *A. sulfonivorans* ЛФ–ГАЛ запатентован [9]. Показана возможность использования бактерий для получения кормовой добавки пребиотического действия [10]. Для выяснения природы множественных молекулярных форм β-галактозидазы *A. sulfonivorans* начаты исследования генетической детерминанты фермента [11].

Цель исследования – клонирование и секвенирование гена, кодирующего β-галактозидазу *A. sulfonivorans*.

Материалы и методы исследования. Объект исследования – штамм *Arthrobacter sulfonivorans* ЛФ–ГАЛ (далее *A. sulfonivorans)*, хранящийся под номером БИМ В-499-Д в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов.

Культуру *A. sulfonivorans* выращивали глубинно с перемешиванием (180–200 об/мин) при 28 °С в течение 24 ч в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл питательной среды, включающей (в %): лактозу – 1,5; пептон – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,5; K_2HPO_4 – 0,3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1; исходный pH – 6,5.

Геномную ДНК из клеток, предварительно разрушенных лизоцимом (100 мг/мл) и додецилсульфатом натрия (0,5 %), выделяли с помощью смеси фенол–хлороформа (1 : 1) и затем подвергали очистке цетавлоном [12] и РНКазой (10 мг/мл). Концентрацию ДНК определяли флуорометрически с использованием Quant-iT dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, США) и прибора Qubit (Life technologies, США).

Оптимизацию ограниченного гидролиза геномной ДНК для получения фрагментов, наиболее полно представленных в диапазоне 4000–6000 пар оснований, проводили с использованием рестрикционной эндонуклеазы *Sau*3AI. Для этого рестрикционную смесь (50 мкл), состоящую из геномной ДНК (5 мкг), 5 мкл NE-buffer 1.1, рестрицирующего фермента *Sau*3AI (1,5 ед.) и деионизированной воды до 50 мкл, инкубировали при 37 °С. Через каждые 15 мин отбирали пробы объемом 5 мкл, смешивали в соотношении 5 : 1 с буфером (10 мМ Трис–HCl, pH 7,5 + 20 % гли-

церина + 0,1 % ДСН + 0,1 % бромфенолового синего) и прогревали для остановки реакции при 65 °С в течение 15 мин. Продукты реакции разделяли методом электрофореза в агарозном геле (0,7 %). Участки геля, содержащие фрагменты ДНК размером 4000–6000 п. о., вырезали и помещали в пробирки, предварительно откалиброванные по весу. Выделение необходимых фрагментов ДНК из геля проводили методом адсорбционной хроматографии на колонках с кремниевыми фильтрами QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, США), следуя инструкции производителя.

Полученные фрагменты ДНК клонировали в предварительно рестрицированном векторе pRSET B (Invitrogen, США). Для этого реакционную смесь, содержащую 3,6 мкг pRSET B, 0,3 мг БСА, 3 мкл буфера E 10x, 20 ед. рестриктазы *Bam*H1 (Promega) и деионизированную воду до объема 30 мкл, инкубировали при 37 °С и обрабатывали 0,5 ед. щелочной фосфатазы FastAP при 37 °С в течение 40 мин. Фрагменты рестрикции вектора разделяли методом электрофореза в агарозном геле и очищали с использованием набора QIAquick Gel Extraction Kit.

Лигирование вектора pRSET B с выделенными фрагментами ДНК *A. sulfonivorans* проводили при их молярном соотношении 1 : 2. Реакционная смесь содержала 25 нг pRSET B, 85 нг фрагментов ДНК, 400 ед. лигазы T4 (Neb, Великобритания), 2 мкл буфера для лигазы T4 и деионизированную воду до объема 20 мкл. Условия проведения лигирования – 16 °С в течение 2 ч, инактивации лигазы – 65 °С в течение 15 мин.

Для проведения процедуры клонирования готовили электрокомпетентные клетки *E. coli* DH5α [13]. Электропорацию проводили на приборе MicroPulser Electroporator (BioRad, США) по инструкции производителя.

Полученные после трансформации клетки *E. coli* DH5α высевали в чашки Петри на агаризованную среду, содержащую (в %): триптон – 1,0; дрожжевой экстракт – 5,0; NaCl – 1,0; ампициллин – 0,01; 5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозид (X-Гал) – 0,002; изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) – 0,024. Клетки инкубировали при 37 °С в течение 12 ч, а затем при 4 °С – 24–48 ч. Колонии бактерий, позитивных по β-галактозидазной активности, детектировали визуально по их ярко-голубой окраске.

Секвенирование ДНК проводили по методу Сэнгера с использованием набора реактивов DNA Cycle Sequencing Kit (Jena Bioscience, Германия). В реакции секвенирования использовали меченые Cy5.5-олигонуклеотиды: T7-pro (5′-taatacgactcactataggg-3′), T7-ter (5′-gctagttattgctcagcgg-3′). Разделение и детекцию фрагментов проводили с использованием секвенатора LI-COR 4300 DNA Analyzer (LI-COR Biosciences, США) согласно прилагаемой инструкции производителя.

Полное секвенирование плазмидной ДНК проводили следующим образом. Плазмиду pRSET B::№5 амплифицировали с помощью iProof-ДНК-полимеразы (Bio-Rad, США) и праймеров T7-pro (5′-taatacgactcactataggg-3′), T7-ter (5′-gctagttattgctcagcgg-3′), после чего из разбавленного до концентрации 0,2 нг/мкл ампликона готовили библиотеку ДНК для секвенирования с использованием набора Nextera XT (Illumina, США). Высокопроизводительное определение нуклеотидных последовательностей проводили на приборе MiSeq (Illumina, США), используя MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina, США).

Для оценки качества полученных данных использовали программу FastQC [14]. Фильтрацию прочтений с низким качеством осуществляли с помощью программы Trimmomatic-0.32 [15], сборку контигов – с использованием программы SPAdes-3.1.0 [16], картирование прочтений на собранные контиги – с помощью программы Bowtie2 [17].

Аннотацию фрагмента хромосомной ДНК бактерий *A. sulfonivorans* осуществляли с помощью веб-ресурса BASys [18], проверку каждой отрытой рамки считывания проводили с помощью программы blastp [19] при сравнении с аминокислотными последовательностями белков из базы данных NCBI Protein Reference Sequences [20].

Результаты и их обсуждение. Ранее были выделены, встроены в вектор pRSET B и клонированы в клетках *E. coli* DH5α фрагменты геномной ДНК бактерий *A. sulfonivorans* размером 4000–6000 п. н. Из числа рекомбинантных клонов *E. coli* DH5α (~40 тыс.), несущих библиотеку генов исследуемого штамма, на селективной среде с ампициллином, ИПТГ и X-гал отобраны 10 колоний, позитивных по β-галактозидазной активности. Обнаружено также, что в условиях глубинного культивирования все они синтезируют каталитически активный ферментный белок, по

электрофоретической подвижности соответствующий одной из молекулярных форм β-галактозидазы *A. sulfonivorans* [11]. И только фермент одного из исследованных рекомбинантов (*E. coli* DH5α pRSET B::№5) был представлен двумя характерными для β-галактозидазы *A. sulfonivorans* молекулярными формами. Это обусловило секвенирование фрагмента хромосомной ДНК исследуемых бактерий, клонированного именно в векторе pRSET B::№5.

Определение полной нуклеотидной последовательности гена β-галактозидазы (β-*gal*), содержащегося в клонированном фрагменте ДНК, затруднялось несколькими объективными факторами. Во-первых, была неизвестна точная локализация β-*gal*, состоящего, как ранее упоминалось, примерно из 4000–6000 п. н. Во-вторых, возможности оборудования позволяли определить до 500–700 п. н. с каждой из сторон клонированного фрагмента, а установленный методом ПЦР размер последовательности ДНК, которую предстояло исследовать, составлял около 6500 п. н.

Для решения указанных проблем вставку хромосомной ДНК *A. sulfonivorans* в составе плазмиды pRSET B::№5 фрагментировали, а затем клонировали ее части. Для субклонирования был выбран вектор pJET1.2 из-за простоты отбора плазмид со «вставками». Последующее секвенирование клонированных фрагментов и анализ расшифрованных последовательностей позволили определить локализацию и полный нуклеотидный состав гена β-галактозидазы.

В результате рестрикционного анализа вектора pRSET B::№5 с использованием ферментов *Hinc*II, *Eco*RV и *Ecl*136II было установлено, что только последняя из исследованных рестриктаз позволяет получить фрагменты ДНК подходящего для их субклонирования размера (рис. 1).

Все пять полученных фрагментов были клонированы в векторе pJET1.2, предварительно обработанном эндонуклеазой рестрикции *Eco*RV. В результате созданы конструкции pJET1.2-1, pJET1.2-2, pJET1.2-3, pJET1.2-4 и pJET1.2-5, которые содержали «вставки» размером около 400, 1200, 300, 4500 и 3500 п. о. соответственно (рис. 2).

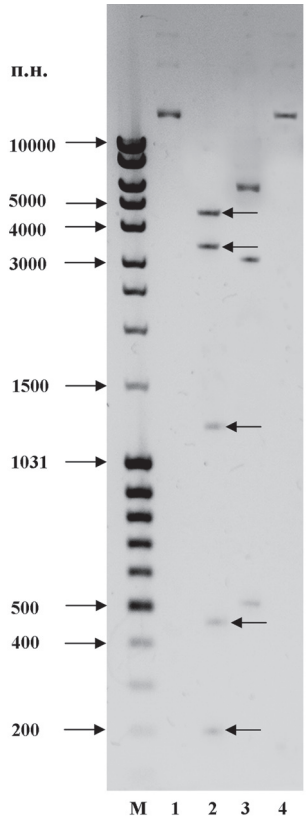

Рис. 1. Электрофореграмма продуктов рестрикции плазмиды pRSET B::№5 по сайтам *Ecl*136II (фрагменты обозначены стрелками), *Hinc*II и *Eco*RV: M – ДНК-маркер (MassRuler DNA Ladder Mix, Литва); плазмида pRSET B::№5 (*1*), рестрицированная эндонуклеазами: *Ecl*136II (*2*), *Hinc*II (*3*) и *Eco*RV (*4*)

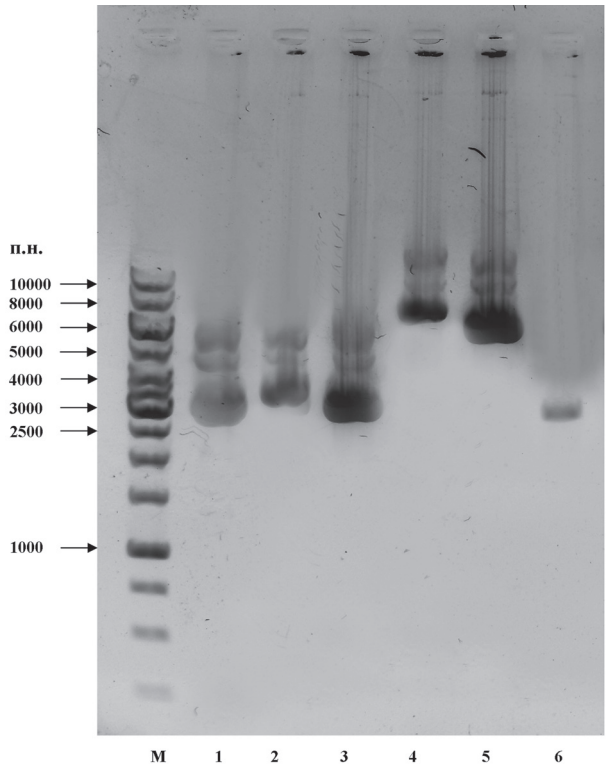

Рис. 2. Электрофореграмма рекомбинантных плазмид pJET1.2, несущих фрагменты хромосомной ДНК *A. sulfonivorans*: M – ДНК-маркер (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Литва); плазмида: pJET1.2-1 (*1*), pJET1.2-2 (*2*), pJET1.2-3 (*3*), pJET1.2-4 (*4*), pJET1.2-5 (*5*), pJET1.2, рестрицированная *Eco*RV (*6*)

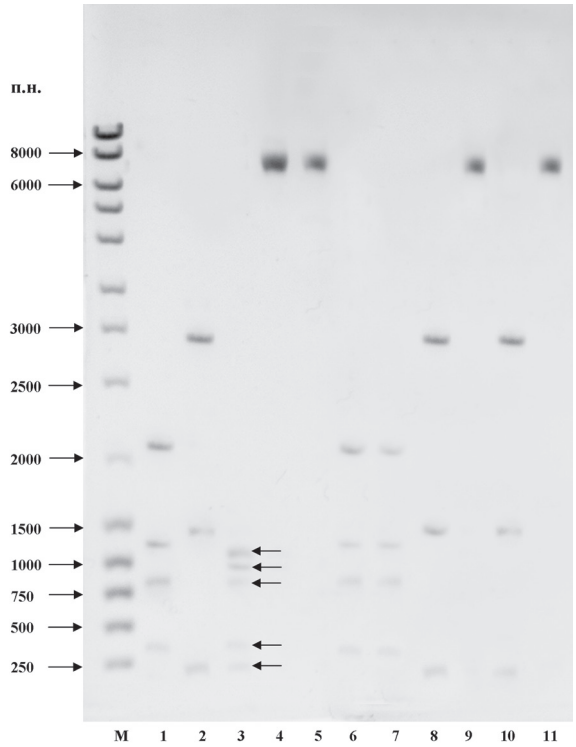

Рис. 3. Электрофореграмма продуктов рестрикции фрагмента ДНК *A. sulfonivorans* по сайтам *Bam*HI, *Xho*I, *Nde*I и *Hind*III: M – ДНК-маркер (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Литва); фрагмент ДНК около 4500 п. н., рестрицированный: *Bam*HI (*1*), *Xho*I (*2*), *Xho*I + *Bam*HI (фрагменты обозначены стрелками) (*3*), *Nde*I (*4*), *Hind*III (*5*), *Bam*HI + *Nde*I (*6*), *Bam*HI + *Hind*III (*7*), *Nde*I + *Xho*I (*8*), *Nde*I + *Hind*III (*9*), *Xho*I + *Hind*III (*10*), контроль (фрагмент ДНК около 4500 п. н.)

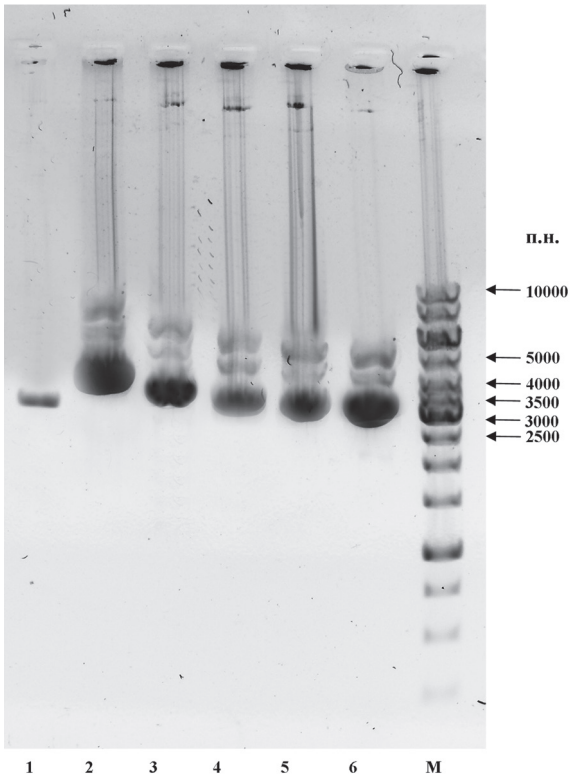

Рис. 4. Электрофореграмма плазмиды pJET1.2, несущей фрагменты хромосомной ДНК *A. sulfonivorans* (второй этап субклонирования). Плазмида: pJET1.2, рестрицированная *Eco*RV (*1*), pJET1.4-1 (*2*), pJET1.4-2 (*3*), pJET1.4-3 (*4*), pJET1.4-4 (*5*), pJET1.4-5 (*6*); M – ДНК-маркер (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Литва)

Нуклеотидная последовательность «вставок», содержащихся в плазмидах pJET1.2-1, pJET1.2-2 и pJET1.2-3 и имеющих небольшие размеры, была определена полностью. В то же время нуклеотидный состав «вставок» в плазмидах pJET1.2-4 и pJET1.2-5 из-за их достаточно больших размеров расшифровать не удалось. Однако было установлено, что плазмида pJET1.2-5 содержит всю нуклеотидную последовательность исходной плазмиды pRSET B и небольшой (около 600 п. н.) фрагмент ДНК *A. sulfonivorans*, который также был секвенирован полностью.

Для установления последовательности нуклеотидов фрагмент ДНК (около 4500 п. н.), клонированный в векторе pJET1.2-4, обрабатывали смесью рестриктаз *Bam*HI и *Xho*I, позволявших получить его части меньшего размера (рис. 3). «Липкие» концы полученных частей достраивали с использованием «Phusion High–Fidelity»-ДНК-полимеразы и клонировали в векторе pJET1.2, предварительно обработанном эндонуклеазой рестрикции *Eco*RV. В результате были получены конструкции pJET1.2-4.1, pJET1.2-4.2, pJET1.2-4.3, pJET1.2-4.4 и pJET1.2-4.5, несущие вставки размером около 200, 350, 850, 1000 и 1100 п. н. соответственно (рис. 4).

Все полученные на различных этапах субклонирования конструкции (pJET1.2-1, pJET1.2-2, pJET1.2-3, pJET1.2-4, pJET1.2-5, pJET1.2-4.1, pJET1.2-4.2, pJET1.2-4.3, pJET1.2-4.4 и pJET1.2-4.5), содержавшие фрагменты ДНК *A. sulfonivorans*, были полностью секвенированы. В результате установлено, что в плазмиде pJET1.2-4.5 «вставка» размером около 1100 п. н. гетерогенна и представлена двумя продуктами рестрикции – 1084 и 1091 п. н. Совокупный анализ расшифрованных последовательностей полученных плазмид и известных последовательностей из базы данных GenBank позволил установить полную нуклеотидную последовательность β-*gal* бактерий *A. sulfonivorans*. Согласно полученным данным, исследуемый ген состоит из 3132 п. н., которые кодируют 1043 аминокислоты.

Результаты высокопроизводительного секвенирования плазмиды pRSET B::№5, выполнение которого стало возможным только на завершающем этапе настоящего исследования, полностью согласуются с данными, полученными в результате субклонирования. Вся расшифрованная последовательность гена β-галактозидазы *A. sulfonivorans* депонирована в базе данных GenBank (KM277894).

Проведено сравнение нуклеотидных последовательностей генов β-галактозидаз *A. sulfonivorans* и микроорганизмов других таксономических групп. Показано, что β-gal исследуемого штамма в наибольшей степени сходен с генами β-галактозидаз, продуцируемых бактериями рода *Arthrobacter* (66–72 %). Соответствие аминокислотного состава β-галактозидаз *A. sulfonivorans* и других представителей этого рода составляет 59–95 %.

Анализ аминокислотной последовательности β-галактозидазы *A. sulfonivorans* в пакете программ BLAST позволил выявить в ее структуре сахар-связывающий домен Glyco_hydro_2_N (pfam02837, 39–227 а.к. остатков), TIM-бочонок (pfam02836, 318–616 а.к. остатков) и small_chain_domain (smart01038, 754–1039 а.к. остатков). Это позволяет отнести β-галактозидазу *A. sulfonivorans* к гликозил-гидролазам 2 семейства.

С учетом аминокислотного состава полипептида, кодируемого β-*gal*, рассчитана масса одной субъединицы β-галактозидазы *A. sulfonivorans*, которая составляет 113,6 кДа. Расчетная и ранее экспериментально установленная (около 124 кДа) величины молекулярной массы субъединицы ферментного белка практически совпадают.

Заключение. Отсутствие сведений о нуклеотидной последовательности гена β-галактозидазы бактерий *A. sulfonivorans* обусловило скрининг и выделение β-*gal* из сконструированной библиотеки фрагментов хромосомной ДНК. В результате проведенного исследования установлено, что ген β-галактозидазы *A. sulfonivorans* состоит из 3132 п. н., определяющих последовательность 1043 аминокислот, характеризуется высокой степенью гомологии с соответствующими генами бактерий рода *Arthrobacter* (69–74 %). Ген кодирует фермент молекулярной массой субъединицы 113,6 кДа, который принадлежит 2 классу гликозил-гидролаз.

Литература

1. *Nath A., Mondal S., Chakraborty S.* et al. // Asia-Pac. J. Chem. Eng. 2014. Vol. 9, is. 3. P. 330–348.
2. *Panesar P. S., Kumari S., Panesar R.* // Enzyme Res. 2010. Vol. 2010. P. 1–16.
3. *Husain Q.* // Crit. Rev. Biotechnol. 2010. Vol. 30, N 1. P. 41–62.
4. *Tang L., Li Z. A., Dong X. X. //* J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2011. Vol. 38. P. 471–476.
5. *Asraf S. S., Gunasekaran P. //* Current trends of ß-galactosidase research and application. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Microbiology book series. 2010, N 2. P. 880–890.
6. *Kastsianevich A. A., Sapunova L. I.* // Сб. мат. II Междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых «Научные стремления–2011». 2011. Т. 1. С. 200–206.
7. *Сапунова Л. И., Костеневич А. А., Лобанок А. Г.* и др. // Докл. НАН Беларуси. 2013. Т. 57, № 6. С. 70–74.
8. *Сапунова Л. И., Костеневич А. А., Лобанок А. Г.* и др. // Докл. НАН Беларуси. 2014. Т. 58, № 4. С. 71–77.
9. Способ получения внеклеточной β-галактозидазы. Патент 15050 РБ. а 20091062; заявл. 14.07.2009; опубл. 28.02.2011.
10. *Сапунова Л. И., Костеневич А. А., Лобанок А. Г.* и др. // Тр. БГУ, сер. физиол., биохимия и молекул. основы функционирования биосистем. 2013. Т. 8, Ч. 1. С. 224–229.
11. *Костеневич А. А., Сапунова Л. И., Лобанок А. Г.* // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. 2014. Т. 6. С. 51–62.
12. *Sambrook J., Frittsch E., Maniatis T.* // Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – 2222 p.
13. http://molbiol.ru/protocol/03_05.html#a1
14. http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/
15. *Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. //* Bioinformatics. 2014. Vol. 30. P. 2114–2120.
16. *Bankevich A., Nurk S., Antipov D. //* J. Comp. Biol. 2012. Vol. 19, N 5. P. 455–477.
17. *Langmead B., Salzberg S. //* Nature Methods. 2012. Vol. 9. P. 357–359.
18. *Van Domselaar G. H., Stothard P., Shrivastava S.* et al. // Nucleic Acids Res. 2005. Vol. 33. P. W455–459.
19. *Altschul S. F., Gish W., Miller W.* J. Mol. Biol. 1990. Vol. 215, N 3. P. 403–410.
20. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/

A. A. KASTSIANEVICH, L. I. SAPUNOVA, A. G. LOBANOK

A.Kastsianevich@gmail.com

CLONING AND SEQUENCING OF GENE ENCODING β-GALACTOSIDASE OF BACTERIA *ARTHROBACTER SULFONIVORANS*

Summary

A full nucleotide sequence of the β-galactosidase gene (β-*gal*) was deciphered by cloning in plasmid pJET1.2 of DNA fragments containing β-*gal* of bacteria *Arthrobacter sulfonivorans* LF-GAL, their subsequent sequencing and comparison with the known sequences from the GenBank database. It was deposited under access number KM2778940.

The evaluation of the β-*gal* structure showed that it is composed of 3132 b.p. encoding 1043 amino acids making up a β-galactosidase subunit with a molecular weight of 113.6 kDa. It was found that β-gal of the examined strain is characterized by the highest degree of similarity to the genes encoding β-galactosidase in the genus *Arthrobacter* (66–72 %).

The amino acid composition of enzyme proteins from *A. sulfonivorans* LF-GAL matches that of other representatives of the genus *Arthrobacter* by 59–95 %. The analysis of the enzyme protein amino acid sequence by BLAST software package demonstrated that β-galactosidase of *A. sulfonivorans* LF-GAL comprises conservative sequences typical for glycosyl hydrolase family 2.