

УДК 577.21

Аспирант С.В. Кирьянова, доцент Д.А. Черенков,
аспирант А.А. Толкачева, профессор О.С. Корнеева
(Воронеж. гос. ун-т инж. технол.) кафедра биохимии и биотехнологии,
тел. (473) 255-38-51

Получение рекомбинантной α -L-фукозидазы (alfB)

В данной работе ген α -L-фукозидазы (AlfB), амплифицированный с помощью ПЦР, был клонирован в составе векторной плазмиды pet23b+ по сайтам *EcoRI* - *XhoI*. Экспрессия гена происходила в клетках *Escherichia coli* top 10 под контролем T7-промотора. Был получен штамм-продуцент рекомбинантного белка α -L-фукозидазы, в результате оптимизации условий действия фермента были определены оптимальные значения pH и температуры.

In this study the gene α -L-fucosidase (AlfB), amplified by PCR was cloned in the vector plasmid pet23b + sites for *EcoRI* - *XhoI*. Gene expression occurred in the cells of *Escherichia coli* top 10 under the control of the T7 promoter. The strain-producer recombinant protein α -L-fucosidase was obtained, optimum values of pH and temperature was determined by optimizing the conditions of the enzyme action.

Ключевые слова: α -L-фукозидаза, клонирование, экспрессия, *Escherichia coli*.

α -L-фукозидазы (КФ 3.2.1.51) – ферменты, относящиеся к классу О-гликозидгидролаз, - расщепляют внутренние фукозидные связи в молекуле фукоидана – полисахаридах клеточных стенок бурых водорослей. Установлено, что образующиеся в результате ферментативного гидролиза фуко-олигосахариды и моносахарид фукоза обладают пребиотическим, иммуностимулирующим действием, а также влияют на репродуктивную функцию живого организма. Поэтому актуальным является создание на их основе лечебно-профилактических средств с иммуностимулирующими свойствами и препаратов, нормализующих и повышающих репродуктивную способность млекопитающих [1].

Сведения о выделенных и охарактеризованных на сегодняшний день α -L-фукозидазах немногочисленны, большинство из них обладают низкой активностью и являются 1,2-экзофукозидазами, вследствие чего не способны гидролизовать фукоидан водорослей, содержащий преимущественно 1,3-, 1,4- и 1,6-фукозидные связи [2,3,4].

Достижения в области технологии молекулярного клонирования и геной инженерии позволяют решить данную проблему путем создания микроорганизмов с заданными генетическими характеристиками, что дает возможность повысить активность и выход целевого

фермента в сравнении с его выходом у нативного продуцента [5]. Наиболее перспективным подходом к получению высокоактивного препарата является создание продуцентов α -L-фукозидазы - рекомбинантных штаммов кишечной палочки, несущих клонированный ген alfB. На сегодняшний день в литературе имеются сведения о клонировании гена alfB в составе вектора pQE80, который экспрессировался в клетки *E. coli*. Также имеются сообщения о рекомбинантных α -L-фукозидазах из *Streptomyces* sp и *Bifidobacterium bifidum* [4,6,7].

Цель настоящего исследования заключалась в клонировании гена alfB с использованием вектора pet23b+, обеспечивающего экспрессию чужеродного гена под контролем T7-промотора и получение рекомбинантного фермента α -L-фукозидазы. Донором ДНК для амплификации гена alfB служил штамм *Lactobacillus rhamnosus* 12L, который используется для приготовления биологически активных добавок, бактериальных препаратов, нормализующих микрофлору кишечника у детей первого года жизни. Штамм получен из Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов, ГосНИИгенетика, Москва. Для отбора рекомбинантных плазмид использовали штамм *Escherichia coli* top 10. В качестве вектора для клонирования использовали плазмиду pet 23 b(+) (Novagen, США). Скрининг трансформированных клеток *E.coli* top 10, несущих

плазмиду pet 23 b(+) с клонированным фрагментом ДНК, проводили по устойчивости полученного штамма к ампициллину в концентрации 100 мкг/мл. Отобранные в результате скрининга колонии выращивали методом глубинного культивирования в орбитальном шейкере-инкубаторе на питательной среде LB, содержащей ампициллин, в течение 6 часов, затем производили индукцию синтеза белка путем добавления IPTG.

Выделение хромосомной и плазмидной ДНК проводили с помощью набора GeneJet Plasmid Midiprep Kit. Рестрикцию, лигирование, электрофорез в агарозном геле, ПЦР проводили по стандартным методикам [5].

Последовательность нуклеотидов гена *alfB* *Lactobacillus rhamnosus* 12L была получена из базы данных NCBI. Кодировочную часть гена α -L-фукозидазы *L. rhamnosus* амплифицировали при помощи ПЦР, используя праймеры EcoR1: 5' –ctatgaattcatggtaaaccatcacctgtc – 3', Xho1: 5' – tacactcgagtaacgatcactaagttgctgc – 3' и хромосомную ДНК *L. rhamnosus* 12L в качестве матрицы. Полученный фрагмент клонировали в векторе pet 23 b (+) по сайтам рестрикции EcoR1 и Xho1. Конструирование праймеров для амплификации клонируемого фрагмента ДНК осуществляли с помощью пакета программы Vector NTI.

ДНК плазмиды и амплификат гена *alfB* расщепляли эндонуклеазами рестрикции EcoR1 и Xho1 (Fermentas) в течение 24 ч в буфере Tango. Линейную форму плазмиды и амплификат после рестрикции очищали электрофорезом в 0,7 %-ном агарозном геле и лигировали с использованием ДНК-лигазы T4 (Fermentas) согласно рекомендациям изготовителя. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* top 10, обработанные хлористым кальцием. Трансформанты высевали на агаризованную среду LB, содержащую 100 мкг/мл ампициллина. Посевы культивировали при 37 °С в течение 12 ч. Отбирали ампициллинрезистентные колонии и определяли присутствие гена *alfB* с помощью праймеров для детекции гена. Из позитивных клонов выделяли плазмидную ДНК и подтверждали наличие в ней вставки гена *alfB* рестрикцией EcoR1 и Xho1 с последующим электрофорезом в агарозном геле.

Активность α -L-фукозидазы определяли по изменению количества свободной фукозы в пробе по методу Дише [8], основанному на способности фукозы при кипячении с сильными минеральными кислотами образо-

вывать 5-метилфурфурол, в отличие от других гексоз, благодаря чему возможно ее дифференцированное определение.

Реакционную смесь, состоящую из 1 мл водного раствора фукоидана с массовой долей 1 % и 1 мл раствора фермента α -L-фукозидазы, инкубировали при температуре 30 °С в течение 1 ч. Через один час гидролиза реактивную смесь фильтровали и разбавляли водой в 20 раз. Затем 1 мл пробы помещали в водяную баню и ставили в морозильник до образования корочки льда. Приливали 4,5 мл H₂SO₄, разведенной дистиллированной водой (1 часть дистиллированной воды - 6 частей H₂SO₄ конц.), перемешивали и оставляли на 10 мин при комнатной температуре. Помещали пробу в кипящую водяную баню на 3 минуты, охлаждали проточной водой. Добавляли 0,1 мл 3 %-го раствора солянокислого цистеина, перемешивали и оставляли на 1,5 ч при комнатной температуре. Измеряли оптическую плотность растворов на спектрофотометре против контроля при длине волны 396 нм (все сахара) и 430 нм (все сахара, кроме метилпентоз). В качестве контроля использовали инактивированный фермент α -L-фукозидазы.

За единицу активности α -L-фукозидазы принимали такое количество фермента, которое образует 1 мМоль фукозы за 1 мин в стандартных условиях.

С целью оптимизации условий действия фермента было исследовано влияние pH среды и температуры на активность целевого фермента, продуцируемого генетически модифицированным штаммом *E. coli* top 10.

Оптимальные значения параметров действия фермента определяли следующим образом: проводили глубинное культивирование рекомбинантного штамма-продуцента α -L-фукозидазы в качалочных колбах емкостью 750 см³, содержащих по 250 см³ питательной среды заданного состава, варьируя значения необходимых параметров.

Для выращивания рекомбинантного штамма *E. coli* top 10 использовали среду Лурия-Бертани (среда LB) следующего состава, %: пептон - 1, дрожжевой экстракт - 0,5, NaCl - 0,5, pH 7.0. Среду стерилизовали в течение 30 минут при 0,8 МПа, охлаждали до 30 °С и засевали бактериальной культурой. Различные значения pH среды устанавливали добавлением 1 н HCl или NaOH.

Таким образом, в ходе работ был получен штамм-продуцент рекомбинантного белка α -L-фукозидазы и определены оптимальные условия действия фермента. В результате скрининга бактериальных штаммов из коллекции

микроорганизмов ВКПМ ГосНИИгенетика в качестве источника целевого гена α -1-фукозидазы был выбран штамм *Lactobacillus rhamnosus* 12L. Выделенный из данного штамма необходимый участок ДНК использовали в качестве матрицы для амплификации гена α -1-фукозидазы с помощью полимеразной цепной реакции, для чего на основе анализа имеющейся в базе данных NCBI нуклеотидной последовательности гена α -1-фукозидазы (AlfB, protein_id="ZP_03212876.1") сконструировали

праймеры Fp-1 (ctatgaattcatgggtaaacatcacctgtc, подчеркнут сайт для рестриктазы *EcoRI*) и Rp-1 (tacactcgagttaacgatcactaagttgctgc, подчеркнут сайт для рестриктазы *XhoI*).

Ожидаемый размер продукта амплификации для гена α -1-фукозидазы равен 45 кДа. В процессе амплификации с праймерами Fp-1 и Rp-1 был получен фрагмент ДНК, соответствующий данному размеру, что подтверждается результатами электрофоретического анализа (рисунок 1).

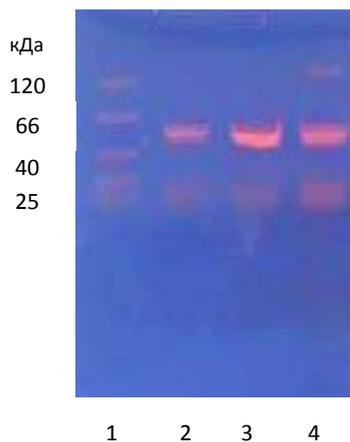


Рисунок 1 – SDS-ПААГ - электрофореграмма продуктов амплификации.
1 - белки-стандарты молекулярной массы (сверху вниз - 120 кДа, 66 кДа, 40 кДа, 25 кДа)
2,3,4 - продукты амплификации

Для клонирования в качестве вектора был выбран экспрессионный вектор pet23b+, предназначенный для экспрессии рекомбинантных белков в *E. coli* и содержащий в своем составе ген резистентности к ампициллину. Ген α -1-фукозидазы перенесли в вектор экспрессии pet23b+ по сайтам рестриктаз *EcoRI-XhoI*. Полученной рекомбинантной плазмидой были трансформированы клетки *E. coli top 10*.

Отобранные генетически модифицированные клетки *E. coli top 10*, содержащие плазмиду с геном α -1-фукозидазы, инкубировали с синтетическим аналогом лактозы - IPTG для индукции экспрессии гена AlfB. После индукции наблюдалось накопление в бактериальных клетках белка соответствующей молекулярной массы (45 кДа) (рисунок 2).

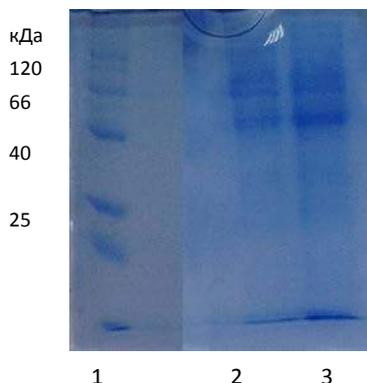
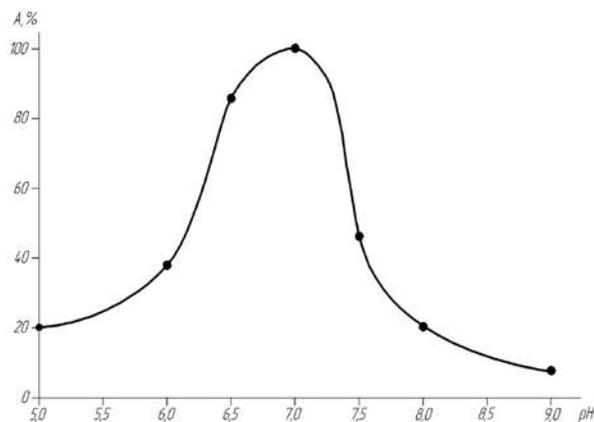


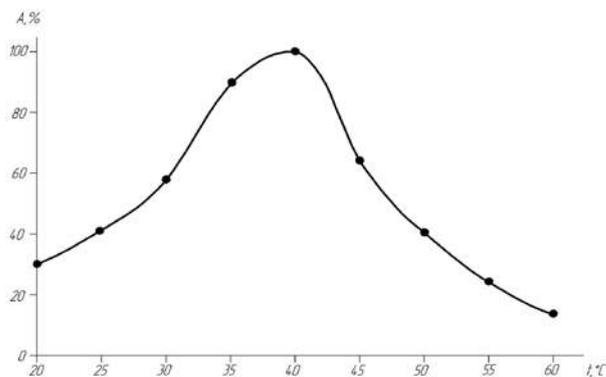
Рисунок 2 – SDS-ПААГ-электрофореграмма клеточных белков генетически модифицированных бактерий *E. coli top 10*
1 - белки-стандарты молекулярной массы (сверху вниз - 120 кДа, 66 кДа, 40 кДа, 25 кДа)
2 - клеточные белки белков генетически модифицированных бактерий *E. coli top 10* без индукции IPTG
3 - клеточные белки белков генетически модифицированных бактерий *E. coli top 10* через 5 часов после индукции IPTG в концентрации 0,1 μmol

Далее была определена область оптимальных значений pH и температур, при которых полученная рекомбинантная α -L-фукозидаза проявляет максимальную активность. Изменение активности α -фукозидазы в зависимости от концентрации ионов водоро-

да представлено на рисунке 3а. Из графика следует, что для α -фукозидазы *E. coli top 10* оптимум действия лежит в области значений pH 7,0. При pH 9,0 фермент почти полностью теряет каталитическую активность.



а)



б)

Рисунок 3 – Зависимость активности α -фукозидазы (% от максимальной) а) от величины pH при температуре 40 °C; б) от температуры при оптимальной величине pH.

На рисунке 3б представлена зависимость активности α -фукозидазы от температуры, которая описывается колоколообразной кривой. Такой характер влияния температуры на активность фермента связан с действием двух факторов: с одной стороны, с увеличением температуры возрастала скорость ферментативной реакции, а с другой – происходила инактивация фермента, вследствие денатурации белка, что приводило к непрерывному уменьшению концентрации активного фермента.

Наиболее интенсивным действием α -фукозидазы обладала при температуре 40 °C, отклонение температуры на 10 °C от оптимального значения приводило к снижению активности на 60 и 40 % соответственно.

В результате проведенной работы нами сконструированы рекомбинантные плазмиды на основе вектора pET23b+, способные к эффективной экспрессии клонированного гена α -L-фукозидазы (*A1fB*) в *E. coli* под контролем T7-промотора. Установлены оптимальные условия действия полученного рекомбинантного фермента. Данные исследования послужат основой для дальнейшей работы по получению стабильного промышленного генно-инженерного штамма *E. coli top 10* - активного продуцента α -L-фукозидазы.

Работа выполнена в рамках НИОКР по программе У.М.Н.И.К. (ГК № 12128р/20823 от 29.07.2013 г.) и ФЦП " Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы" (ГК № 14.512.11.0069 от 17.04.2013 г.).

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Черенков, Д.А. Фукоза: биологическая роль, пути получения и перспективы применения [Текст] / Д.А. Черенков, Ю.А. Рыбаков, Т.В. Санина и др. // Биотехнология. - 2010. - №6. - С. 63-71.
- 2 Aminoff, D. Purification and general properties of 1,2 -L-fucosidase from *Clostridium Perfringens* [Text] / D. Aminoff, K. Furukawa // J. Biol. Chem. – 1970. – V. 245. – P. 1659-1669.
- 3 Kurimura, Y. Efficient production and purification of extracellular 1,2-alpha-L-fucosidase of *Bacillus* sp. K40T [Text] / Y. Kurimura // Biotechnol Biochem. - 1995. – V. 59. - № 4. – P. 589-594.
- 4 Katayama, T. Molecular cloning and characterization of *Bifidobacterium bifidum* 1,2- α -L-fucosidase (*AfcA*), a novel inverting glycosidase (Glycoside Hydrolase Family 95) [Text] / Katayama T. // J Bacteriol. – 2004. – V. 186. - № 15. – P. 4885–4893.

5 Sambrook, J. Molecular cloning [Text]: laboratory manual / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. - New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – 452 p.

6 Rodriguez-Diaz, J. Utilization of natural fucosylated oligosaccharides by three novel alpha-L-fucosidases from a probiotic *Lactobacillus casei* strain [Text] / J. Rodriguez-Diaz, V. Monedero, M.J. Yebra // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2011. – V. 77. – P. 703-705.

7 Sano, M. Purification and characterization of alpha-L-fucosidase from *Streptomyces* species [Text] / M. Sano, K. Hayakawa, I. Kato // *J. Biol. Chem.* – 1992. – V. 267. - № 3. – P. 1522-1527.

8 Польшалина, Г.В. Определение активности ферментов [Текст]: справочник / Г.В. Польшалина, В.С. Чердынченко, Л.В. Римарева. - М.: ДеЛи принт, 2003. - 375 с.

REFERENCES

1 Cherenkov, D.A. Fucose : biological role, ways of obtaining and application prospects [Text] / D.A. Cherenkov, Y.A. Rybakov, T.V. Sanina, et al // *Biotechnology.* - 2010. - № 6. - P. 63-71 .

2 Aminoff, D. Purification and general properties of 1,2 -L-fucosidase from *Clostridium Perfringens* [Text] / D. Aminoff, K. Furukawa // *J. Biol. Chem.* – 1970. – V. 245. – P. 1659-1669.

3 Kurimura, Y. Efficient production and purification of extracellular 1,2-alpha-L-fucosidase of *Bacillus* sp. K40T [Text] / Y. Kurimura // *Biotechnol Biochem.* - 1995. – V. 59. - № 4. – P. 589-594.

4 Katayama, T. Molecular cloning and characterization of *Bifidobacterium bifidum* 1,2- α -L-fucosidase (AfcA), a novel inverting glycosidase (Glycoside Hydrolase Family 95) [Text] / Katayama T. // *J. Bacteriol.* – 2004. – V. 186. - № 15. – P. 4885–4893.

5 Sambrook, J. Molecular cloning [Text]: laboratory manual / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. - New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – 452 p.

6 Rodriguez-Diaz, J. Utilization of natural fucosylated oligosaccharides by three novel alpha-L-fucosidases from a probiotic *Lactobacillus casei* strain [Text] / J. Rodriguez-Diaz, V. Monedero, M.J. Yebra // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2011. – V. 77. – P. 703-705.

7 Sano, M. Purification and characterization of alpha-L-fucosidase from *Streptomyces* species [Text] / M. Sano, K. Hayakawa, I. Kato // *J. Biol. Chem.* – 1992. – V. 267. - № 3. – P. 1522-1527.

8 Polygalina, G.V. Determination of enzyme activity [Text]: a guide / G.V. Polygalina, V.S. Cherednychenko, L.V. Rimareva. – М.: DeLee print, 2003. - 375 p.