

УДК 602.7:579.25:577.152.321

А. В. КАЧАН, А. Н. ЕВТУШЕНКОВ

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ α -АМИЛАЗЫ *BACILLUS* SP. 1–15

Белорусский государственный университет, Минск, e-mail: av.kachan@mail.ru

(Поступила в редакцию 31.05.2012)

Введение. Ферменты, осуществляющие гидролиз крахмалосодержащего сырья, широко используются в современной биотехнологической промышленности [1]. Среди гидролизующих крахмал и сходные соединения ферментов α -амилазы (КФ 3.2.1.1) имеют важное коммерческое значение. Для использования в разнообразных промышленных процессах α -амилазы должны соответствовать ряду требований, таких как устойчивость к высоким температурам, детергентам, активность при низких либо высоких значениях pH, определенная субстратная специфичность.

Ферменты с α -амилазной активностью выделены из многих организмов [2]. Для промышленных нужд чаще всего используются бактериальные α -амилазы, продуцируемые бактериями рода *Bacillus*, а также α -амилазы из грибов рода *Aspergillus*. Синтезируемые бактериями рода *Bacillus* α -амилазы имеют температурные оптимумы в диапазоне 50 – 90 °С в зависимости от организма-продуцента, а также ряд других ценных в биотехнологии характеристик [2]. На данный момент такие виды, как *B. subtilis*, *B. licheniformis* и *B. amyloliquefaciens* используются как коммерческие продуценты термостабильных амилаз [3]. Кроме того, из природных источников выделено большое количество микроорганизмов, синтезирующих новые α -амилазы с разнообразными характеристиками [2].

Целью данной работы было клонирование гена термостабильной амилазы из споровых бактерий. Для этого из образца силоса выделен и охарактеризован изолят *Bacillus* sp. 1–15, синтезирующий термостабильные амилолитические ферменты. Проведено клонирование гена амилазы в клетках *Escherichia coli*, а также определена его нуклеотидная и аминокислотная последовательности и некоторые свойства фермента.

Материалы и методы исследования. Бактерии изолята *Bacillus* sp. 1–15 были выделены из образца силоса. Бактерии штаммов *E. coli* XL1-Blue (F⁻: Tn10(Tet^r), *proA*⁺*B*⁺, *lacI*^q, Δ (*lacZ*) *M15* / *recA1*, *endA1*, *gyrA96*(Nal^r), *thi-1*, *hsdR17* (*r_k*⁻ *m_k*⁻), *glnV44*, *relA1*, *lac*) и *E. coli* BL21(DE3) (F⁻ *ompT gal dcm lon hsdSB*(r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3) *pLysS*(Cm^r)), взятых из коллекции штаммов микроорганизмов кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ, использовали для клонирования рекомбинантных плазмид, сконструированных на основе pUC18 и pET24b(+) (Novagene). Для культивирования бактерий использовали среду Лурия-Бертани (LB). В качестве плотной питательной среды использовали среду LB, содержащую 1,5 % агар-агара.

Выделение плазмидной ДНК, агарозный гель-электрофорез, рестрикцию, лигирование, кальциевую трансформацию проводили по стандартным методикам, описанным в руководстве Т. Маниатиса [4]. Выделение ДНК из агарозного геля осуществляли с помощью набора DNA Extraction Kit (Fermentas).

Морфологическая и физиолого-биохимическая характеристика изолята *Bacillus* sp. 1–15 проводилась с использованием стандартных методик [5]. Полученные результаты анализировали с помощью «Краткого определителя бактерий Берги» [6].

Для изучения синтеза фермента бактерии *Bacillus* sp. 1–15 культивировали в среде LB, содержащей 1 % растворимого крахмала, 168 ч при 37 °С с аэрацией. Каждые 24 ч отбирали 2 мл культуры. Надосадок после осаждения клеток использовали в качестве источника фермента для из-

мерения амилолитической активности. Клеточный осадок использовали для измерения количества белка по методу Брэдфорд [7].

Измерение амилолитической активности проводили с помощью метода определения количества восстанавливающих сахаров [8] с небольшими модификациями. В субстратную смесь объемом 0,45 мл, включавшую 1,1 % растворимого крахмала и 0,22 мМ CaCl₂ в 50 мМ Na-фосфатном буфере (рН 7,0) добавляли 50 мкл аликвоты фермента и инкубировали 15 мин при 70 °С. Реакцию останавливали добавлением 1,5 мл реактива с 3,5-динитросалициловой кислотой [9], после чего пробирки помещали в кипящую воду на 12 мин. После охлаждения интенсивность светопоглощения измеряли при 540 нм. За 1 единицу активности амилазы принимали такое количество фермента, которое приводило к образованию 1 мкмоль редуцирующих сахаров (в эквиваленте глюкозы) за 1 мин реакции в 1 мл реакционной смеси в условиях проведения эксперимента.

Термоинактивацию фермента изучали инкубацией при различных температурах смеси, содержащей источник фермента в соответствующем разведении в 50 мМ Na-фосфатном буфере (рН 7,0) в присутствии 0,2 мМ CaCl₂. Пробы отбирали каждые 10 либо 20 мин и помещали на ледяную баню на 15 мин, после чего измеряли остаточную амилолитическую активность. Все эксперименты проводились в трех повторностях. Статистическая обработка результатов измерений проводилась в программе Microsoft Office Excel 2003. Для оценки достоверности различий применяли *t*-критерий Стьюдента ($P < 0,05$).

Для амплификации гена амилазы использовали тотальную ДНК бактерий *Bacillus* sp. 1–15, изолированную по Bron [10] и олигонуклеотиды *aml1-f* (5'-TTTTCATATGAAACAACAAAAACG GCTTTACGCCCG-3') и *aml1-r* (5'-TTTTAAGCTTCTTTGAACATAAATTGAAACCGACCCG-3') к 5'- и 3'-концам консенсусной последовательности гена *B. licheniformis*. Олигонуклеотиды содержали сайты узнавания для рестриктаз NdeI и HindIII соответственно (подчеркнуты).

Смесь для ПЦР объемом 50 мкл включала в себя 150 пг хромосомальной ДНК, по 0,6 мкМ каждого из праймеров, 0,2 мМ dNTP, 2 мМ MgSO₄ и 1,5 единиц активности Pfu-полимеразы (Fermentas). Амплификацию проводили со следующими параметрами: этап предденатурации – 2,5 мин при 95 °С; 25 циклов амплификации – 1 мин при 95 °С, 30 с при 67 °С и 4,5 мин при 72 °С; этап достройки цепей – 15 мин при 72 °С. Продукт ПЦР очищали из агарозного геля, обрабатывали рестриктазами NdeI и HindIII и лигировали с обработанной этими же ферментами плазмидной ДНК рЕТ24b(+). Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* DH5α. Из библиотеки плазмидных ДНК отбирали клоны, содержащие плазмиды рЕТ-24b(+) со вставками необходимой длины, что подтверждалось рестрикционным анализом.

Для экспрессии гена амилазы клетки *E. coli* BL21(DE3) трансформировали плазмидной ДНК рЕТ24b-*amy1*–15. Индукцию экспрессии в системе рЕТ осуществляли по предложенному производителем протоколу (Novagene). Пробы культуры объемом 8 мл отбирали через 3, 6 и 15 ч после начала индукции. Клетки осаждали при 5000 об/мин 5 мин. В качестве внеклеточной фракции использовали надосадочную жидкость. Осадок ресуспендировали в 1,5 мл 50 ммоль/л Na-фосфатного буфера (рН 7,0) и обрабатывали ультразвуком (22 кГц, 2 обработки по 5 – 10 с, интервал между обработками – 1 мин). Обломки клеток удаляли центрифугированием, надосадок использовали в качестве внутриклеточного экстракта.

Секвенирование ДНК проводилось по методу Сэнгера с использованием набора реактивов Cycle ReaderTM Auto DNA Sequencing Kit (Fermentas) и меченых Cy5-праймеров M13/pUC. Разделение и детекция фрагментов проводились с помощью системы ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech) по рекомендуемой производителем методике.

Результаты и их обсуждение. Бактерии изолята *Bacillus* sp. 1–15 были выделены из образцов силоса в Лельчицком районе Беларуси. Изолят *Bacillus* sp. 1–15 был способен синтезировать термостабильные амилолитические ферменты.

Изучение морфологических и биохимических свойств изолята (табл. 1) на основании сведений «Краткого определителя бактерий Берги» [6] позволило предположить, что выделенные бактерии принадлежат к виду *B. licheniformis*.

Синтез амилолитических ферментов бактериями *Bacillus* sp. 1–15 в среде LB с растворимым крахмалом начинался через 24 ч культивирования после достижения стационарной фазы. Мак-

Таблица 1. Морфологические и биохимические свойства изолята *Bacillus* sp. 1–15

Температурный диапазон роста	18 – 52 °С
Оптимальная температура роста	Около 40 °С
Эндоспоры	Эллиптические, внутри клетки, центрально либо субтерминально
Рост в присутствии 7% NaCl	+
Анаэробный рост	+
Утилизация (с образованием кислоты без выделения газа)	Глюкоза, фруктоза, мальтоза, лактоза, галактоза, манноза, ксилоза, сахароза, маннит, сорбит
Утилизация цитрата	+
Гидролиз желатина	+
Гидролиз крахмала	+
Гидролиз целлюлозы	–
Гидролиз казеина	+
О/Ф-тест	Метаболизм дыхательного и бродильного типа
Восстановление нитратов	+
Реакция Фогеса – Проскауэра	+

симальное накопление фермента в культуральной жидкости наблюдалось через 144 ч (рис. 1). Эти данные соответствуют кривым роста и накопления амилаз у других бактерий из рода *Bacillus*, для которых также характерно накопление фермента после достижения стационарной фазы роста [11].

Стабильность амилазы *Bacillus* sp. 1–15 в неочищенном препарате определяли путем инкубации смеси при 80, 85, 90 и 94 °С. Полученные кривые инактивации, представленные на рис. 2, позволяют сделать вывод, что амилолитической фермент штамма *Bacillus* sp. 1–15 обладает высокой термостабильностью.

Для амплификации и последующего клонирования гена амилазы бактерий *Bacillus* sp. 1–15 в плазмиде рЕТ-24b(+) на основе кодирующих последовательностей ранее клонированных α -амилаз *B. licheniformis* (коды доступа в Genbank: CP000002.3, AE017333.1, FJ556804.1, GQ262779.1) были сконструированы олигонуклеотиды am11-f и am11-g к 5'- и 3'-концам консенсусной последовательности гена *B. licheniformis*. Праймер к 3'-концу гена конструировали таким образом, чтобы стоп-кодом для гена амилазы выступал кодон ТАА в составе экспрессирующей кассеты рЕТ-24b(+).

В результате ПЦР образовывался единственный фрагмент размером около 1550 пар нуклеотидов. Продукт ПЦР встраивали в плазмиду рЕТ-24b(+) и вводили в клетки *E. coli* DH5 α . Полученные рекомбинантные векторные конструкции были названы рЕТ24b-amy1–15.

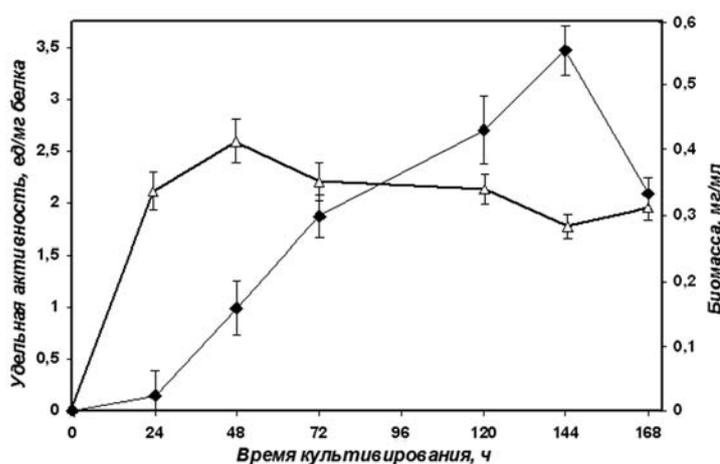


Рис. 1. Динамика клеточного роста (среднее массы белка \pm стандартное отклонение) и продукции амилазы (среднее удельной активности \pm стандартное отклонение) бактериями изолята *Bacillus* sp. 1–15

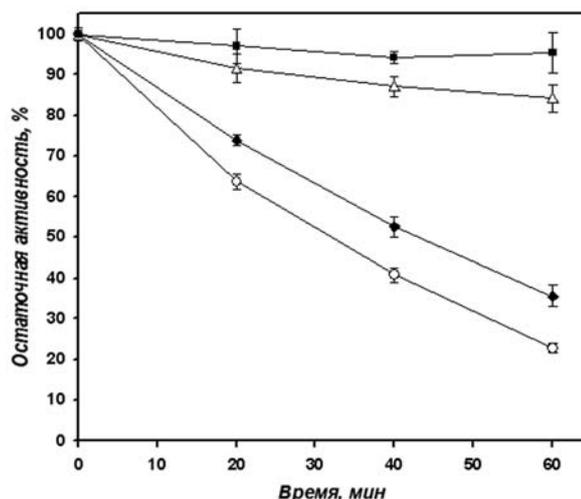


Рис. 2. Временная зависимость температурной инактивации (среднее арифметическое остаточной активности \pm стандартное отклонение) амилазы штамма *Bacillus* sp. 1–15 при 80 (■), 85 (Δ), 90 (◆) и 94 (○) °С

Изучение экспрессии рекомбинантного фермента клетками *E. coli* BL21(DE3), содержащими плазмиду pET24b-amy1-15, показало, что значительное количество продукта после индукции накапливается как во внеклеточной жидкости, так и внутри клеток. Результаты измерения амилолитической активности представлены в табл. 2. Пересчет амилазной активности на объем бактериальной культуры показывает, что большая часть синтезируемого фермента накапливается во внеклеточной жидкости. Способность клеток *E. coli* выделять α -амилазы *Bacillus* в периплазму и культуральную жидкость при использовании векторов экспрессии показана и в других исследованиях [12,13]. Такое поведение фермента связывают с наличием нативного сигнального пептида α -амилаз, распознаваемого системой секреции II типа в клетках *E. coli* [13]. Достоверный механизм попадания рекомбинантных белков в культуральную жидкость, однако, на данный момент не выяснен [14].

Таблица 2. Активность амилазы *Bacillus* sp. 1-15 в культуре клеток *E. coli* BL-21 (DE3), содержащих плазмиду pET24b-amy1-15

Время индукции	Активность, ед/мл		Активность, ед/мл культуры	
	Культуральная жидкость	Внутриклеточный экстракт	Культуральная жидкость	Внутриклеточный экстракт
0	0,46	1,81	0,46	0,36
3	2,23	2,84	2,23	0,57
6	3,28	3,78	3,28	0,76
15	3,69	3,51	3,69	0,7

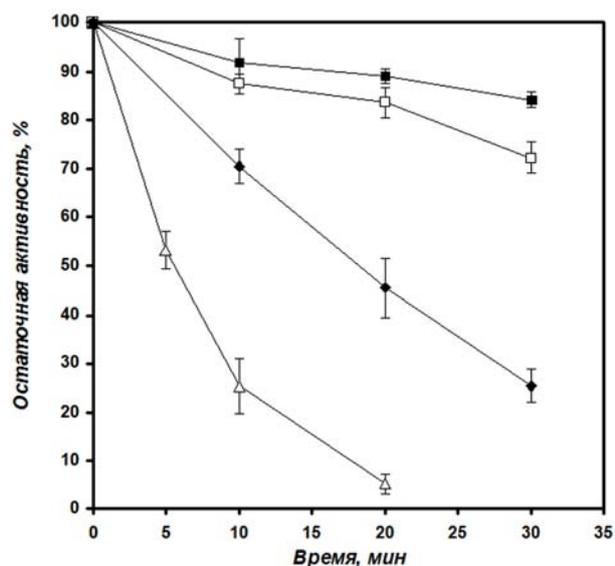


Рис. 3. Временная зависимость температурной инaktivации (среднее арифметическое остаточной активности \pm стандартное отклонение) рекомбинантной амилазы штамма *Bacillus* sp. 1-15 при 74 (■), 77 (□), 80 (◆) и 84 (Δ) °C

Стабильность частично очищенного препарата рекомбинантной амилазы определяли путем инкубации при 74, 77, 80 и 84 °C. Полученные кривые инaktivации, представленные на рис. 3, показывают, что препарат выдерживает долговременную инкубацию при 77 °C, однако быстро инaktivируется при температурах выше 84 °C. Термостабильность частично очищенного препарата амилазы ниже по сравнению с ферментом из культуральной жидкости *Bacillus* sp. 1-15, что может быть объяснено наличием в неочищенном препарате стабилизирующих амилазы веществ (крахмала, мальтоолигосахаридов) [2].

В качестве матриц для секвенирования использовали ДНК векторных конструкций на основе pUC18, содержащих фрагменты клонированного гена. В результате секвенирования установлено, что клонированная нуклеотидная последовательность имела длину 1536 нуклеотидов. Последовательность была размещена в GenBank под кодом доступа JX090594. Последовательность была сопоставлена с известными последовательностями амилолитических белков с помощью программы BLAST. Ген исследуемой амилазы имеет высокий уровень идентичности с ранее клонированными генами α -амилаз из различных штаммов *B. licheniformis* (от 93 до 99 %).

Заключение. В результате изучения морфологических и биохимических свойств природного изолята *Bacillus* sp.1-15 было установлено, что изолят принадлежит к виду *Bacillus licheniformis*. Максимальное накопление термостабильного амилолитического фермента в культуральной жидкости происходит на 6-е сутки культивирования штамма *Bacillus* sp. 1-15. Ген амилазы из *Bacillus* sp. 1-15 был клонирован в клетках *Escherichia coli* в составе вектора экспрессии pET24b-amy 1-15. Показано, что ген амилазы успешно экспрессируется клетками *E. coli* BL21(DE3).

Кодирующая последовательность гена *Bacillus* sp. 1–15 длиной 1536 нуклеотидов характеризуется высокой степенью сходства с генами α -амилаз различных штаммов *B. licheniformis* (93–99 % идентичности). Благодаря высокой термостабильности амилаза штамма *Bacillus* sp. 1–15 является привлекательным объектом изучения с целью последующего промышленного использования.

Работа выполнена при поддержке гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Б11М-192).

Литература

1. Van der Maarel M. J. E. C., van der Veen B., Uitdehaag J. C. M. et al. // J. Biotechnol. 2002. Vol. 94, № 2. P. 137 – 155.
2. Gupta R., Gigras P., Mohapatra H. et al. // Process Biochem. 2003. Vol. 38, № 11. P. 1599 – 1616.
3. Schallmeyer M., Singh A., Ward O. P. // Can. J. Microbiol. 2004. Vol. 50, № 1. P. 1 – 17.
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., 1984. С. 116, 162 – 167, 333 – 335.
5. Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М. Практикум по микробиологии. М., 2005. С. 115 – 142.
6. Краткий определитель бактерий Берги / Под ред. Дж. Хоулта. М., 1980. С. 286 – 294.
7. Bradford M. M. // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248 – 254.
8. Ghorbel R. E., Maktouf S., Massoud E. B. et al. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2009. Vol. 157, № 1. P. 50 – 60.
9. Miller G. L. // Anal. Chem. 1959. Vol. 31, № 3. P. 426 – 429.
10. Bron S. Molecular biological methods of *Bacillus*. L.: John Wiley & Sons Ltd., 1990. P. 75 – 174.
11. Goyal N., Gupta J. K., Soni S. K. // Enzyme Microb. Technol. 2005. Vol. 37, № 7. P. 723 – 734.
12. Shahhoseini M., Ziaee A. A., Ghaemi N. // J. Appl. Microbiol. 2003. Vol. 95, № 6. P. 1250 – 1254.
13. Yamabhai M., Emrat S., Sukasem S. et al. // J. Biotechnol. 2008. Vol. 133, № 1. P. 50 – 57.
14. Ni Y., Chen R. // Biotechnol. Lett. 2009. Vol. 31, № 11. P. 1661 – 1670.

A. V. KACHAN, A. N. EVTUSHENKOV

CLONING OF THE THERMOSTABLE α -AMYLASE GENE FROM *BACILLUS* SP. 1–15

Summary

Morphological and biochemical characteristics of a new native isolate *Bacillus* sp. 1–15 was carried out in this study. The isolated strain produced thermostable amylolytic enzymes. The gene encoding the amylase from *Bacillus* sp. 1–15 strain was isolated by PCR and cloned in *Escherichia coli* BL21(DE3) cells in pET24b-*amyl*-15 expression vector. Production of the active recombinant enzyme was confirmed. The nucleotide sequence of the *Bacillus* sp. 1–15 amylase gene was determined. The coding sequence of the gene consisted of 1536 base pairs was highly homologous with genes of α -amylases from *B. licheniformis* strains.