

природные биоценозы, исследовать его приживаемость и способность к регуляции численности патогенов.

1. Т.А. Нугманова, М.Г. Осипова, М.В. Кабаргина, Биотехнологические аспекты производства экологически чистых безпестицидных продуктов питания // Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты. Вып. 6. - М.: Изд-во РАЕН, 2002. – С. 9-20.
2. Дж. Мейнелл, Э. Мейнелл, Экспериментальная микробиология. – М.: Мир, 1967. – С. 320.
3. Й. Сэги, Методы почвенной микробиологии. – М.: Колос, 1983. – С. 253.

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ АМИЛАЗЫ *BACILLUS* SP. В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

А.В. Качан, О.Б. Русь, А.Н. Евтушенко

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

ZRbio@mail.ru

Амилолитические ферменты способны гидролизовать различные типы гликозидных связей в крахмале, декстрани, гликогене и родственных полисахаридах, благодаря чему находят широкое применение во многих промышленных процессах и особенно при ферментативной переработке крахмала. В мировой практике в качестве продуцентов коммерческих препаратов термостабильных амилаз широко используются бактерии рода *Bacillus*. Продуцируемые ими ферменты отличаются большим разнообразием в плане субстратной специфичности (α - и β -амилазы, пуллулазы), и, что немаловажно для промышленных целей, могут проявлять активность при экстремальных значениях pH и температуры.

В ходе ранее проведённых исследований [1] из образцов почвы выделен штамм бактерий *Bacillus* sp. 406, клетки которого способны синтезировать термостабильную амилазу. Обнаружено, что данный фермент характеризуется высокой термостабильностью – при инкубации в течение 1 часа при 80 °С активность неочищенного ферментного препарата снижается лишь на 11 % от первоначальной. Для идентификации и дальнейшего изучения данного фермента была проделана работа по клонированию гена амилазы в клетках бактерий *E. coli*. Для этого из клеток *Bacillus* sp. 406 выделяли хромосомальную ДНК, которую подвергали неполному гидролизу рестриктазой *Hind*III. Полученные рестрикты разделяли посредством агарозного гель-электрофореза, фрагменты ДНК размером от 1 до 7 т.п.н. очищали с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit. Выделенные фрагменты лигировали с ДНК вектора pUC18, ранее обработанной той же рестриктазой. Полученными конструкциями трансформировали клетки *E. coli* XL1-Blue методом электропорации. Трансформантов отбирали на среде с X-gal, содержащей 50 мкг/мл ампициллина. Среди 25 тыс. образовавшихся трансформантов 1650 было протестировано на наличие амилолитической активности путём посева на поверхность среды, содержащей 1% растворимого крахмала. Отбирали клоны, вокруг которых обнаруживались светлые зоны гидролиза крахмала после прокрашивания чашек со средой раствором, содержащим 0,5 % (w/v) I₂ и 5 % (w/v) KI.

Из бактерий четырех штаммов *E. coli* XL1-Blue, образующих зоны гидролиза крахмала наибольшего диаметра, выделена плазмидная ДНК, которую обрабатывали рестриктазой *Hind*III. С помощью агарозного гель-электрофореза была определена длина клонированного фрагмента в каждой из выделенных рекомбинантных плазмидных ДНК. Размер вставок в исследуемых вариантах плазмиды pUC18*amy* составил от 4 до 7 т.п.н. Учитывая то, что длина гена амилазы колеблется около значения 1,5 т.п.н. [2], это дает основание предполагать, что в данных плаزمидях присутствует инсерция полноразмерного гена

амилазы *Bacillus* sp. 406. Для дальнейшей работы выбран штамм, содержащий плазмидную ДНК pUC18::*amy6* с клонированным фрагментом наименьшей длины – около 4,1 т.п.н.

С целью исследования секреции рекомбинантной амилазы из клеток *E. coli* проведена трансформация бактерий *E. coli* BL-21 (DE3) плазмидной ДНК pUC18::*amy6*. Для фракционирования использовали 6-ти и 14-ти часовые культуры клеток *E. coli* BL-21 (DE3) с плазмидой pUC18::*amy6*, выращенные в среде LB с 1% растворимого крахмала и 50 мкг/мл ампициллина при 37 °С. Фракционирование клеток проводили методом осмотического шока по методике [3]. Эффективность фракционирования оценивали по уровням активностей β-галактозидазы (маркера цитоплазматической фракции) и щелочной фосфатазы (маркера периплазматической фракции). Амилолитическую активность определяли, как описано ранее [1]. Определение активности амилазы в различных фракциях клеток *E. coli* BL-21 (DE3), содержащих pUC18::*amy6*, показало, что около 91% амилазы после 14 часов культивирования накапливается в культуральной жидкости, тогда как в периплазматическом пространстве и цитоплазме остается лишь 2,28% и 6,49% фермента соответственно (таблица). Таким образом, рекомбинантная амилаза почти полностью секретируется клетками *E. coli*.

Таблица

Активность амилазы *Bacillus* sp. 406 в клетках *E. coli* BL-21 (DE3)

Время культивирования	Фракция	Активность амилазы	
		в ед/мл культуры	в %
6 часов	культуральная жидкость	4,5	91
	периплазма	0,084	1,7
	цитоплазма	0,37	7,3
14 часов	культуральная жидкость	5,2	91,23
	периплазма	0,13	2,28
	цитоплазма	0,36	6,49

Способность клеток *E. coli* секретировать амилазы *Bacillus* в периплазматическое пространство и далее в культуральную жидкость описана и другими исследователями [4-6]. Так, в работе [6] указывается, что после 24 часов культивирования бактерий *E. coli* BL-21 (DE3) уровень секреции не только амилазы *B. licheniformis*, но и хитиназы *B. licheniformis* и маннаназы *B. subtilis*, гены которых клонированы в векторе pET21d, составил от 85% до 95%.

Таким образом, в ходе проделанной работы был клонирован полноразмерный ген термостабильной амилазы *Bacillus* sp. 406 в клетках *E. coli* BL-21 (DE3). Около 91% рекомбинантной амилазы накапливалось в культуральной жидкости после 14 часов культивирования, причем результаты по изучению уровней активности данного фермента в различных фракциях *E. coli* сопоставимы с данными, полученными ранее в других лабораториях.

1. А.В. Качан, О.Б. Русь, А.Н. Евтушенко. Выделение и характеристика штамма *Bacillus* sp. 406, продуцирующего термостабильную амилазу // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: материалы VI Междунар. науч. конф., Минск, 2-6 июня 2008 г. Мн., 2008. С. 147-149.
2. Fitter J. Structural and dynamical features contributing to thermostability in α-amylases // Cell. Mol. Life Sci.–2005.–V. 62, № 17.–P. 1925–1937.
3. Copeland B. R., Richter R. J., Furlong C. E. Renaturation and Identification of Periplasmic Proteins in Two-dimensional Gels of *Escherichia coli* // J. Biol Chem Vol. 257, No. 24, 15065-15071, 1982.
4. H.K. Manonmani, A.A.M. Kunhi. Secretion to the growth medium of an α-amylase by *Escherichia coli* clones carrying a *Bacillus laterosporus* gene. // World J. Microbiol. Biotechnol.-1999.-V. 15.-P. 475-480.

5. M. Shahhoseini, A.-A. Ziaee, N. Ghaemi. Expression and secretion of an α -amylase gene from a native strain of *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli* by T7 promoter and putative signal peptide of the gene. // J. Appl. Microbiol.-2003.-Vol. 95.-P.1250-1254.
6. M. Yamabhai, S. Emrat, S. Sukasem, P. Pesatcha, N. Jaruseranee, B. Buranabanyat. Secretion of recombinant *Bacillus* hydrolytic enzymes using *Escherichia coli* expression systems // J. Biotechnol.-2008.-V. 133.- P. 50–57.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ *ERWINIA AMYLOVORA*, ИЗОЛИРОВАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

И.В. Кудина, А.Л. Лагоненко, А.Н. Евтушенко

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Kuddya@gmail.com.

Бактериальный ожог плодовых, возбудителем которого является фитопатогенная бактерия *Erwinia amylovora*, - одно из наиболее серьезных заболеваний плодовых и ягодных культур. Впервые обнаруженное еще в 1883 г. в Северной Америке [1] сейчас оно распространено более чем в 40 странах мира, включая Литву, Украину и Польшу. Бактериоз поражает растения из семейства *Rosaceae*. Экономически наиболее важными хозяевами для данного фитопатогена являются *Pyrus* spp., *Malus* spp., *Cydonia* spp., *Eriobotrya japonica*, *Cotoneaster* spp., *Crataegus* spp., *Pyracantha* spp. и *Sorbus* spp. Молодые деревья при благоприятных для патогена условиях могут погибать при единичном заражении за один сезон. В мире ежегодные убытки от бактериального ожога составляют десятки миллионов долларов.

В 2007 г. бактериальный ожог плодовых впервые обнаружен в Беларуси в Мядельском и Узденском районах. Штаммы, являющиеся возбудителем заболевания, были выделены в чистую культуру. Для характеристики штаммов использовался метод молекулярной дифференциации бактериальных штаммов методом сравнения нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК.

Нами было осуществлено секвенирование фрагментов генов 16S рРНК из белорусских штаммов *E. amylovora* L3-5 и E-3. Сопоставление полученных последовательностей с 12 известными последовательностями генов 16S рРНК различных штаммов *E. amylovora*, выделенных на территории Англии, Франции, Нидерландов, Германии, Швейцарии, Канады, США, Египта, Японии, позволили построить филогенетическое дерево.

В 2000 году Misuno и соавт. на основании бактериологического анализа и ДНК-ДНК гибридизации предложили разделение природных штаммов *E. amylovora* на четыре биовара [2]. Штаммы, выделенные из *Pyrus ussuriensis* (Mishirazu) (Груша уссурийская) были отнесены к биовару 4, из *Rubus idaeus* (Малина обыкновенная) – к биовару 3. Изоляты из растений *Malus sylvestris* (Яблоня дикая), *Pyrus communis* (Груша), *Cotoneaster melanocarpus* (Кизильник черноплодный), *Crataegus monogyna* (Боярышник однопестичный), *Mespilus germanica* (Мушмула обыкновенная) – к биоварам 1 и 2. К биовару 4 относятся штаммы *E. amylovora* Ea 9471 и YPPS 175, к биовару 3 – PD 2915 и NCPPB 2291, к биоварам 1 и 2 – 1/79, NCPPB 1734, LMG 2024, NCPPB 311, LMG 1985, ICMP 4245, 88125, LNPVUB 615.

Филогенетический анализ фрагментов генов 16S рРНК позволил разделить 14 штаммов *E. amylovora* на две группы. Штаммы, относящиеся к биоварам 1, 2 и 3 были объединены в первую группу, а штаммы, относящиеся к биовару 4 – во вторую. Белорусские изоляты E3 и L3-5, также как и типовые штаммы 1/79 и LMG 2024, попадают в пределы первой группы, однако занимают в ней обособленное положение.

1. Burrill T.J. New species of Micrococcus. // Am. Naturalist, - 1883. – V.17. –p. 319;
2. Mizuno A., Sato S., Kawai A. e.a. // J. Gen. Plant. Pathol., - 2000. – V.66, pp. 48–58.