

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР-МЕТОДА ДЛЯ ПОИСКА БАКТЕРИЙ, ТРАНСФОРМИРУЮЩИХ НИТРИЛЫ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Максимов А.Ю., Кузнецова М.В., Максимова Ю.Г.,
Козлов С.В., Демаков В.А.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия
maks@iegm.ru

В настоящее время все большее применение получают методы генетического анализа, позволяющие на ранних этапах осуществить направленную селекцию штаммов с заданными свойствами. Поиск бактерий, обладающих ферментными системами гидролиза нитрилов, может быть ускорен с помощью ПЦР-анализа генов нитрилгидратаз и нитрилаз [1].

Объектами исследования были штаммы микроорганизмов, эффективно конвертирующие нитрилы карбоновых кислот, полученные ранее путем скрининговых исследований микрофлоры объектов окружающей среды (почва, вода) Пермского края. Анализировалось две группы штаммов: 1) полученные при селекции на ацетонитриле в 1998-2000 гг.; 2) утилизирующие изобутиронитрил в качестве единственного источника углерода, выделенные в 2002-2004 гг. Всего в работе было использовано более 60 бактериальных культур с высокой активностью нитрилгидратазы и/или нитрилазы. Среди выделенных штаммов обнаружены продуценты термостабильных нитрилгидратаз и нитрилаз [2].

Гены, контролирующие гидролиз нитрилов, у описанных в литературе штаммов - продуцентов нитрилгидролизующих ферментов, имеют хромосомную локализацию [3]. В результате выделения ДНК и электрофоретического анализа у данных штаммов не обнаружено плазмид. Агенты, излечивающие от плазмид (бромистый этидий и митомицин С), не элиминировали ферментативную активность и способность к росту на нитрилах в качестве единственного субстрата.

В работе были использованы праймеры к консервативным и полным последовательностям генов нитрилгидратаз известных штаммов *R. rhodochrous* J1 и *Rhodococcus* sp. N-771, нитрилаз бактерий *R. rhodochrous* J1, K22, *Comomonas testosteroni* L32589, *Klebsiella pneumoniae* pBrx9, *Alcaligenes faecalis* JM3, *A. facilis* 72W. Также были разработаны праймеры, комплементарные нуклеотидными последовательностями генов, кодирующих амидазы известных штаммов *Rhodococcus*. Праймеры для амплификации были сконструированы с использованием баз данных GENBANK.

В почвенных культурах, выделенных на ацетонитриле и изобутиронитриле, детектированы фрагменты, соответствующие консервативным и полным последовательностям генов α - и β -субъединиц Fe-зависимой нитрилгидратазы. На матрице ДНК штаммов K12(ОМ) и K12ЖР с праймерами, специфичными к генам β -субъединицы кобальтсодержащей нитрилгидратазы детектированы фрагменты, соответствующие данному гену. У ряда штаммов амплифицированы фрагменты ДНК, соответствующие полной последовательности гена амидазы. В результате ПЦР-анализа в геномной ДНК почвенных штаммов идентифицированы последовательности ДНК, соответствующие генам нитрилаз из описанных ранее штаммов бактерий *R. rhodochrous* K22, *A. faecalis* JM3, *A. facilis* 72W.

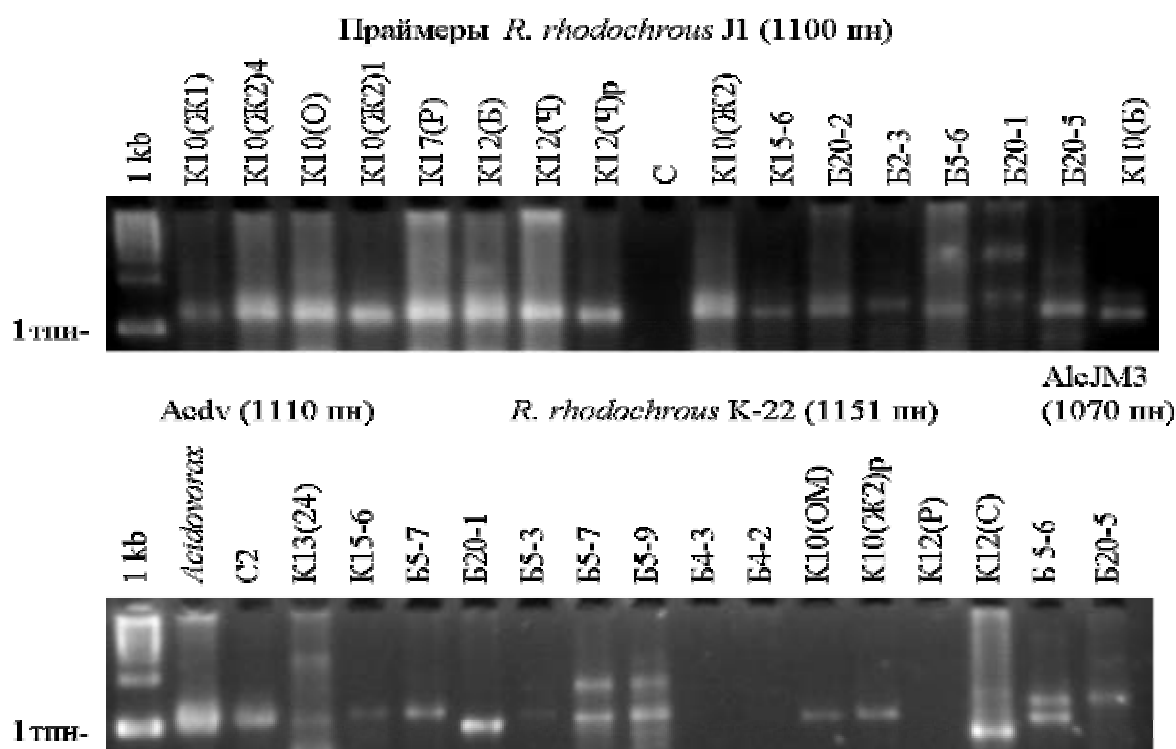


Рис. 1. Электрофорез ПЦР-продуктов ДНК ряда почвенных изолятов, соответствующих генам нитрилиз из *R. rhodochrous* J1, *R. rhodochrous* K-22, *A. Facilis* 72W, *Alc. faecalis* JM3.

Ни в одном из образцов геномной ДНК выделенных почвенных изолятов не удалось обнаружить нуклеотидных последовательностей, гомологичных генам нитрилиз описанных ранее штаммов *C. testosteroni* и *K. pneumoniae* pBrx9.

Таким образом, показано, что полимеразная цепная реакция является простым, быстрым и специфичным методом идентификации генов, контролирующих гидролиз нитрилов карбоновых кислот. С учетом того, что экспрессия фермента зависит от ряда специфических факторов, а традиционные методы скрининга не позволяют быстро дифференцировать нитрилизную активность от нитрилгидратазной и амидазной, данный метод может быть использован в процессе селекции нитрил-утилизирующих микроорганизмов,

Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН «Научные основы сохранения биоразнообразия России», программы Отделения биологических наук РАН «Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами», программы совместных интеграционных исследований УрО РАН совместно с учеными СО РАН.

Список литературы

1. Precigou S., Goulas P., Duran R. Rapid and specific identification of nitrile hydratase (NHase)-encoding genes in soil samples by polymerase chain reaction // FEMS Microbiology Letters. - 2001. - 204. - P.155-161.
2. Козлов С.В., Максимов А.Ю., Кузнецова М.В., Овечкина Г.В., Демаков В.А. Выделение штаммов, обладающих термостабильной нитрилизной и нитрилгидратазной активностью // Тезисы докладов 6-й Пущинской конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пущино. - 2002. - Т.3. - С.29.
3. Kobayashi M., Horinouchi S., Beppu T., Shimizu S. Biochemical and genetic analysis of nitrile metabolism in *Rhodococcus* strains // Biotechnology. - 1995. - V. 7-8. - P. 136-138.