Штамм-индикатор	Диаметр зоны задержки роста, мм				
	M8	F14	F17	F18	F19
P. syringae S-10	17,25±1,37	20,50±2,75	20,50±2,75	21,75±2,75	20,25±2,75
P. atrofaciens 7967	18,25±1,25	18,25±2,75	19,75±0,85	18,00±0,50	18,75±2,25
P. lachrymans 7595	18,25±1,12	19,75±0,37	20,25±0,75	20,75±1,25	20,25±0,37
P. lachrymans 146	21,30±1,10	24,70±0,75	23,75±1,25	22,75±0,50	21,60±1,75
P. glycinea 8541	19,25±0,75	20,75±2,25	21,13±1,12	19,75±1,38	20,00±1,00
P. vignae 1025	25,80±2,10	24,67±1,10	24,50±0,67	24,67±1,78	25,30±1,50
E. aroideae 348	15,25±0,37	19,25±2,12	21,25±1,38	20,50±1,00	17,50±1,00
E. carotovora Д261	17,25±1,75	18,50±2,25	19,75±1,38	18,75±1,25	17,75±1,75

Примечание. Исследуемый штамм высевали медальонами диаметром 5 мм и выращивали в течение 20 ч при 28 °С.

.

УДК 575.*117*.2

Н.Г. ДОРУЖИНСКАЯ, Е.В. КУЛИК, Е.А. НИКОЛАЙЧИК, И.М. ЛИМОРОВА, А.Н. ЕВТУШЕНКОВ

СОЗДАНИЕ СЕКРЕТОРНОГО ВЕКТОРА НА ОСНОВЕ ЛИДЕРНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА ЦЕЛЛЮЛАЗЫ *ERWINIA CHRYSANTHEMI**

New secretion vector containing the *Erwinia chrysanthemi* cellulase signal sequence was constructed for the periplasmic localization of recombinant proteins in Gram negative bacteria. The gene encoding xylose isomerase from *Arthrobacter nicotianae* was cloned in secretion vector containing cellulase promoter and expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells. Periplasmic production of the active recombinant enzyme implies the recognition of the cellulase signal peptide by *E. coli* secretory system. This study recommends the use of this signal peptide for periplasmic production of other foreign proteins in *E. coli.*

В процессе промышленного получения белков с использованием штаммов-продуцентов особую значимость приобретает возможность накопления белкового продукта за пределами клеток, что обеспечивает его повы-

* Авторы статьи - сотрудники кафедры молекулярной биологии.

шенную биологическую активность, высокую стабильность и растворимость. Кроме того, внеклеточная локализация продукта устраняет необходимость разрушения клеток, которая приводит к его загрязнению цитоплазматическим содержимым.

Большинство фитопатогенных бактерий выделяют во внешнюю среду комплекс ферментов, разрушающих ткани инфицированных растений [1]. У грамотрицательных фитопатогенных бактерий первым этапом на пути секреции ферментов является их экспорт из цитоплазмы через цитоплазматическую мембрану в периплазму. В процессе транслокации сигнальная пептидаза распознает и отщепляет лидерный пептид пробелка, что приводит к локализации зрелого белка в периплазматическом пространстве клеток [2].

В основе методологического подхода по созданию секреторного вектора - использование N-концевой лидерной последовательности целлюлазы фитопатогенных бактерий *Erwinia chrysanthemi (Ech)* ENA 49.

Для изучения функционирования созданного вектора использовался модельный цитоплазматический белок ксилозоизомераза (КФ 5.3.1.5) *Arthrobacter nicotianae* B-5-МГ-1. Этот фермент не обладает строгой субстратной специфичностью и ускоряет как реакцию изомеризации D-ксилозы в D-ксилулозу, так и D-глюкозы в D-фруктозу [3]. Благодаря катализу последней реакции ксилозоизомераза широко используется в промышленности при производстве фруктозных сиропов из осахаренного крахмалсодержащего сырья.

Целью данной работы явилось конструирование вектора, с помощью которого можно направленно получать гетерологичные белки в периплазме клеток грамотрицательных бактерий, а также изучение локализации модельного белка ксилозоизомеразы в клетках *E. coli* BL21 (DE3).

Материал и методика

Использованные в работе штаммы и плазмиды представлены в таблице.

Штаммы бактерий и плазмиды и их характеристики

Штаммы бактерий и плазмиды	Характеристика	Источник получения
Escherichia coli XL1-Blue	F' $lacI^q$ (lacZ)M15 $proA^+B^+$ Tn10/0(lac-proAB) thi gyrA96 recA1 endA1 hsdR17 relA1 supE44	Коллекция НИЛ молекулярной генетики бактерий
E. coli BL21 (DE3)	F', ompT, $hsdS_B(r_B^-,m_B^-)$, dcm, gal, λ(DE3)	Коллекция НИЛ молекулярной генетики бактерий
pUC18/19	Ap^r lacZ rep	Коллекция НИЛ молекулярной генетики бактерий
pCel	Ap^r, pUC18, содержащая *BamHI*-фрагмент хромосомы *Ech* ENA 49	Данная работа
pC11	Ap^r, pUC18, содержащая *MluI*-фрагмент хромосомы *Ech* ENA 49 из pCel	Данная работа
pC12	Ap^r, pUC18, содержащая *BamHI/BglI*-фрагмент хромосомы *Ech* ENA 49 из pC11	Данная работа
pC16	Ap^r, pUC18, содержащая *HincII/PstI*-фрагмент хромосомы *Ech* ENA 49 из pC12	Данная работа
pLD	Ap^r, pUC19, содержащая амплифицированный 0,4 т. п. н. *BamHI/PstI*-фрагмент хромосомы *Ech* ENA 49	Данная работа
pSD	Ap^r, pUC19, содержащая амплифицированный 1,2 т. п. н. *BclI/EcoRI*-фрагмент хромосомы *Arthrobacter nicotianae* B-5-МГ-1	Данная работа
pLDxylA	Ap^r, pUC19, содержащая 0,4 т. п. н. *NcoII/EcoRI*-фрагмент из pLD и 1,2 т. п. н. *PagI/EcoRI*-фрагмент из pSD	Данная работа
pES1	Ap^r, pUC18, содержащая 2,7 т. п. н. *EcoRI*-фрагмент хромосомы *Arthrobacter nicotianae* B-5-МГ-1	Евтушенков А.Н., 2002 [10]

Культивирование бактерий *E. coli* штамма XL1-Blue проводили при 37 ˚С, штамма BL21 (DE3) - при 28 ˚С на полноценной питательной среде, содержащей (г/л): триптон - 10, дрожжевой экстракт - 5, NaCl - 10. Величину накопления бактериальной биомассы выражали в единицах оптической плотности (D_{600}). На каждой из исследованных фаз роста бактериальную культуру отбирали в объеме, содержащем 10 единиц D_{600}.

Фракционирование клеток бактерий осуществляли методом осмотического шока, как описано в [4]. Чистоту полученных фракций оценивали по уровню активности маркерных белков - р-галактозидазы (цитоплазма) и щелочной фосфатазы (периплазма). Реакционная смесь для определения активности р-галактозидазы содержала: 4 мг ОНФГ (о-нитрофенил-b-D-галактопиранозид), 1 мл 0,2 М К, Na-фосфатного буфера (рН 7,8), 100 мкл клеточного экстракта. Реакцию проводили при 37 ˚С и останавливали добавлением 1 мл 1 М Na_2CO_3. Ферментативную активность рассчитывали по формуле и выражали в условных единицах:

$$A=D_{420}/(V\cdot T)\cdot 1000,$$

где D_{420} - оптическая плотность раствора, измеренная при 420 нм; *V*- объем реакционной смеси, мл; *T*- время инкубации, с.

Активность щелочной фосфатазы определяли после инкубации реакционной смеси при 37 ˚С, содержащей 3,33 мг нитрофенилфосфата, 2 мл 0,1 MTris/HCl (рН 8,5) и 100 мкл клеточного экстракта. Интенсивность окраски смеси измеряли при длине волны 405 нм. Ферментативную активность рассчитывали по той же формуле, что и активность р-галактозидазы, после чего определяли их процентное содержание во фракциях.

Манипуляции с ДНК, электрофорез в агарозном геле, трансформацию бактерий плазмидной ДНК проводили по стандартным методикам, описанным в руководстве [5]. Для амплификации фрагментов ДНК использовали полимеразную цепную реакцию. Матрицей служила плазмидная ДНК. Реакцию проводили в амплификаторе geneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) по общепринятой методике [5], используя специфические праймеры:

cel1: 5′ CTTCTGCAGAAGGTATTAGGAAACCACT 3′;
cel2: 5′ GGTGGATCCATGGCCCAGGCATTACTGGAAAG 3′;
xylA1: 5′ CATTGATCATGACTCTTCAGCCAACCC 3′;
xylA2: 5′ CGAATTCTCAGCGGGCGCCCAGCA 3′.

ДНК секвенировали методом дидезокситерминаторов [6] с использованием соответствующего набора на основе Т7 ДНК полимеразы (AutoRead sequencing kit производства Amersham Pharmacia Biotech, Швеция) на автоматическом секвенаторе ALFexpress II (Amersham, Швеция) в соответствии с инструкциями производителя. Полученные последовательности идентифицировали при помощи программ из пакета BLAST [7].

Реакционная смесь для определения активности ксилозоизомеразы содержала: 0,1 мл 1 М раствора ксилозы, 0,25 мл 0,2 М К, Na-фосфатного буфера (рН 7,8), 0,05 мл 0,1 М $MgSO_4$, 0,1 мл ферментного раствора и 0,5 мл дистиллированной воды. Длительность реакции изомеризации - 1 ч при 70 ˚С. За единицу активности ксилозоизомеразы принимали количество фермента, необходимое для изомеризации 1 мкмоль D-ксилозы в D-ксилулозу за 1 мин в описанных условиях. Ферментативную активность выражали в ед./мл культуральной жидкости. Количественное определение D-ксилулозы проводили цистеин-карбазольным методом [8].

Количество белка находили по Бредфорду [9], рН - потенциометрически.

В работе приведены средние данные опытов, выполненных в трех повторностях.

Результаты и их обсуждение

С целью получения нуклеотидной последовательности, детерминирующей лидерный пептид целлюлазы, использовали клонированный ранее в

фазмиду фрагмент хромосомной ДНК *Ech* ENA49, содержащий ген целлюлазы *(celZ).* Далее этот фрагмент был переклонирован в мультикопийный вектор pUC18 с образованием гибридной плазмиды pCel. Для определения локализации сигнальной последовательности гена *cell* было проведено рестрикционное картирование клонированного фрагмента ДНК. С использованием полученных рестрикционных карт был создан ряд плазмид, содержащих фрагменты гена целлюлазы (pC11 - pC16), которые применяли для секвенирования. Как следует из данных секвенирования рекомбинантной плазмиды pC16, фрагмент хромосомной ДНК *Ech* ENA49 на 90 % гомологичен гену, кодирующему эндо-1,4-р-глюконазу Z бактерий *Ech* 3937. Результаты секвенирования были использованы для конструирования праймеров, позволяющих амплифицировать регуляторную область и лидерную последовательность целлюлазы (праймеры cel1 и cel2). Размер полученного ПЦР-продукта, составляющий 0,4 т. п. н., указывал на то, что амплифицированный фрагмент хромосомной ДНК содержит промоторную область и нуклеотидную последовательность, детерминирующую лидерный пептид целлюлазы. Данный ПЦР-продукт был клонирован по сайтам *PstI* и *BatHI* в вектор pUC19. В полученную гибридную плазмиду pLD в дальнейшем клонировали структурный ген, кодирующий ксилозоизомеразу (рис. 1 а).

Структурный ген ксилозоизомеразы *(xylA)* из бактерий *Arthrobacter nicotianae* был амплифицирован методом ПЦР с использованием праймеров xy*lA*1 и *xylA*2. ПЦР-продукт размером 1,2 т. п. н. был обработан рестриктазами *BclI* и *EcoRI* и клонирован в плазмиду pUC19, рестрицированную эндонуклеазами *BatHI* и *EcoRI,* в результате чего была получена плазмида pSD (рис. 1 б).

На заключительном этапе конструирования вектора секреции ксилозоизомеразы структурный ген *xylA* был вырезан по сайтам *PagI* - *EcoRI* из плазмиды pSD и переклонирован в вектор pLD по сайтам *NcoI* - *EcoRI* (рис. 1 *в).* Таким образом, сконструированная плазмида pLD*xylA* содержала полную кодирующую последовательность гена *xylA,* помещенную непосредственно за промотором и лидерной последовательностью целлюлазы. Для анализа полученных рекомбинантных плазмид использовали не менее восьми клонов плазмидной конструкции.

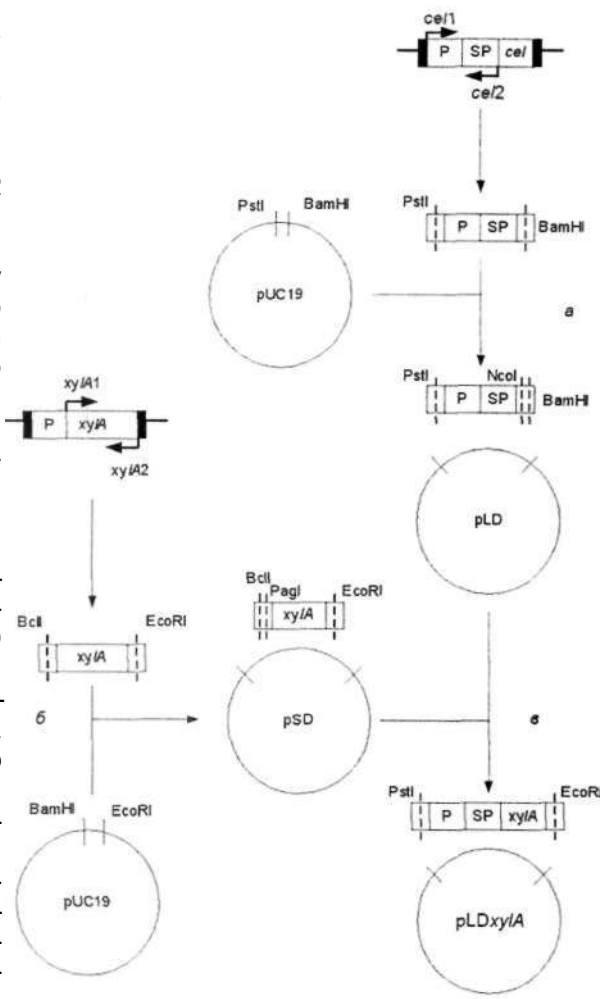

Рис. 1. Схема конструирования вектора секреции ксилозоизомеразы pLD*xylA*: P – промотор, SP – сигнальная последовательность

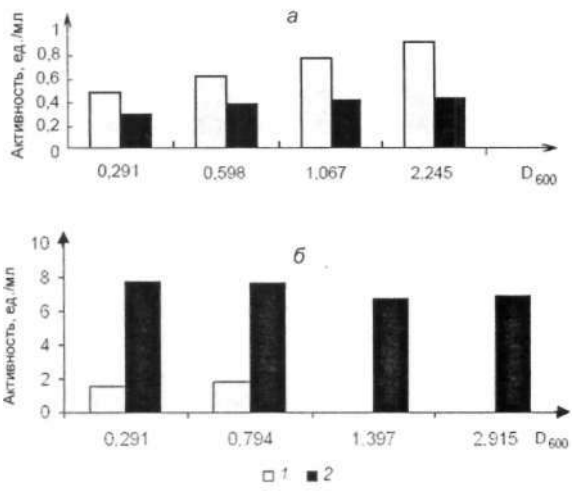

Рис. 2. Активность ксилозоизомеразы в периплазме и цитоплазме клеток бактерий *E. coli* BL21 (DE3), содержащих плазмиду pLD*xylA* (*а*) и плазмиду pES1 (*б*): *1* – периплазма, *2* – цитоплазма

С целью проверки функционирования сконструированного вектора изучали экспрессию гена *xylA,* находящегося в составе плазмиды pLDxy/*A*, по накоплению фермента ксилозоизомеразы в цитоплазматической и периплазматической фракциях клеток бактерий *E. coli* BL21 (DE3). Согласно результатам измерения уровня активности маркерных ферментов (β-галактозидазы и щелочной фосфатазы), эффективность разделения цитоплазматической и периплазматической фракций клеток составила 70 %. Как показано на рис. 2 а, активность ксилозоизомеразы регистрируется в цитоплазме и в периплазме клеток бактерий *E. coli* BL21 (DE3). Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что в клетках *E. coli* происходит конститутивная экспрессия гена *xy/A*, находящегося в составе плазмиды pLDxy/*A,* с образованием биологически активного продукта. Причем наличие активности ксилозоизомеразы в периплазме указывает на то, что секреторная система бактерий *E. coli* BL21 (DE3) распознает лидерный пептид целлюлазы *Ech* ENA49 и направляет синтезированную ксилозоизомеразу в периплазму. Учитывая, что извлекалось только около 70 % периплазматической фракции, можно полагать, что большая часть синтезированной ксилозоизомеразы накапливается в периплазме. Как показал анализ ксилозоизомеразной активности (в ед./мл), в периплазме клеток *E. coli* BL21 (DE3) в процессе роста бактерий данная ферментативная активность постепенно повышается. Поскольку количество клеток, отобранных на каждой из указанных фаз роста, было одинаковым, то возрастание ферментативной активности, выраженной в ед./мл культуры, может быть обусловлено постепенным накоплением белка за счет непрерывного его синтеза с последующей транслокацией через цитоплазматическую мембрану.

Подтверждением экспорта ксилозоизомеразы в периплазму клеток *E. coli* BL21 (DE3) служат результаты эксперимента по изучению локализации этого фермента в данных бактериальных клетках, содержащих плазмиду pES1, в которой ген *xylA* находится под регуляцией собственного промотора и продукт экспрессии не содержит лидерного пептида. В частности, как показано на рис. 2 б, ксилозоизомеразная активность сосредоточена в цитоплазме, что указывает на неспособность данного белка транслоцироваться через цитоплазматическую мембрану в периплазматическое пространство клеток.

Таким образом, в результате проделанной работы был сконструирован вектор pLD, с помощью которого можно направленно получать гетерологичные белки в периплазме клеток грамотрицательных бактерий. Показано, что клонирование в состав плазмиды pLD гена ксилозоизомеразы приводит к его эффективной экспрессии в клетках *E. coli* BL21 (DE3) с образованием активного и стабильного продукта. Благодаря наличию лидерного пептида целлюлазы *Ech* ENA49 рекомбинантная ксилозоизомераза экспортируется в периплазму клеток *E. coli* BL21 (DE3). Вектор pLD можно использовать для получения биотехнологических белков с их локализацией в периплазме.

1. Barras F., van Gijsegem F., Chatterjee A.K. // Anna Rev. Phytopathol. 1994. Vol. 32. P. 201.
2. Economu A. // Trends Microbiol. 1999. Vol. 7. №8. P. 315.
3. Bhosale S.H., Rao M.B., Deshpande V.V. // Microbiol. Rev. 1996. Vol. 60. №2. P. 280.
4. CopelandB.R., RichterR.J., FurlongC.E. // J. Biol. Chem. 1982. Vol, 257. №24. P. 15065.
5. Ausubel F.A., Brent R., Kingston R.F. et al. Current protocols in molecular biology. New York, 1992.
6. Sanger F., Nickien S., Coulson A.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1977. Vol. 74. P. 64.
7. AltschulS.F., Madden T.L., Schaffer A.A. et al. // Nucl. Acids Res. 1997. Vol. 25. P. 3389.
8. Dische Z., Borenfreund E. //J. Biol. Chem. 1951. Vol. 192. P. 583.
9. Bradford M. M. // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248.
10. Евтушенков А. Н., Селезнева Ю.В., Зеленова Е.А. и др. // Материалы междунар. конф. «Микробиология и биотехнология XXI столетия». Мн., 2002. С. 132.

Поступила в редакцию 27.02.06.

Наталья Григорьевна Доружинская- аспирант. Научный руководитель - А.Н. Евтушенков.
Елена Вячеславовна Кулик- кандидат биологических наук, младший научный сотрудник.
Евгений Артурович Николайчик- кандидат биологических наук, доцент.
Ирина Михайловна Лиморова - ассистент.
Анатолий Николаевич Евтушенков - доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой.