

УДК 577.152.1

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ИЗ ДРОЖЖЕЙ *TRIGONOPSIS VARIABILIS*

Е.Е. Давыдова*, В.И. Тишков

(Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; e-mail: vit@enz.chem.msu.ru)

Оксидаза D-аминокислот (DAAO) является одним из двух ферментов, используемых при ферментативном получении из цефалоспориноса С 7-аминоцефалоспориновой кислоты – исходного соединения для синтеза β-лактамных антибиотиков нового поколения. Для создания высокоэффективного биокатализатора окисления цефалоспориноса С, ген оксидазы D-аминокислот из дрожжей *Trigonopsis variabilis* (*daao*) был клонирован в клетках *E. coli*. Методика клонирования включала выделение суммарной мРНК, получение кДНК со специфического праймера и амплификацию гена с помощью ПЦР со специфическими праймерами. Продукт ПЦР был клонирован в векторной плазмиде *E. coli* под контролем промотора фага T7. Показана экспрессия гена *daao* в клетках рекомбинантного штамма *E. coli*.

Оксидазы D-аминокислот (КФ 1.4.3.3, DAAO) являются флавопротеинами, катализирующими окисление D-аминокислот до соответствующих α-кетонив и амиака. Эти ферменты могут продуцироваться различными микроорганизмами при определенных условиях (дрожжи *Trigonopsis variabilis* [1], *Candida tropicalis* [2], *Rhodotorula gracilis* [3], водоросли *Chlorella vulgaris* [4], грибы *Neurospora crassa* [5] и др.). Кодирующая оксидазы D-аминокислот кДНК была выделена также из млекопитающих (человек, свинья, кролики, мыши, крысы) [6].

Оксидазы D-аминокислот имеют большое биотехнологическое значение. Эти ферменты могут быть использованы в производстве L-аминокислот, а также для получения α-кето-кислот из D-аминокислот. Но наиболее важным является процесс получения 7-аминоцефалоспориновой кислоты из цефалоспориноса С с помощью биферментной системы, состоящей из оксидазы D-аминокислот и ацилазы 7-глутарилцефалоспориновой кислоты. Исходным соединением для получения полусинтетических β-лактамных антибиотиков нового поколения является 7-аминоцефалоспориновая кислота [7].

Согласно литературным данным, наиболее привлекательным для этих целей является фермент из дрожжей *T. variabilis*. Поскольку уровень синтеза DAAO в природном штамме очень низкий [8], то для его получения в больших количествах возникает необходимость создания генно-инженерного штамма – продуцента DAAO *T. variabilis*. Цель данной работы состояла в клонировании гена *daao* из *T. variabilis* и его экспрессии в клетках *E. coli*.

Методы исследования

В работе использовали штамм дрожжей *Trigonopsis variabilis* 340А из коллекции Государственного научного центра по антибиотикам. Культуру дрожжей поддерживали на твердой среде Сабуро: солодовый экстракт (2 г/л), дрожжевой экстракт (1 г/л), D,L-метионин (0,2 г/л), агар (20 г/л). Для выделения хромосомной ДНК клетки выращивали в колбах для культивирования объемом 800 мл с 50 мл жидкой среды (4% кукурузного экстракта, 2% глюкозы, 0,3% D,L-метионина) при 28° в условиях интенсивной аэрации (200 об/мин) в течение 72 ч. Для выделения препарата мРНК использовали свежую культуру клеток, выращенную на небогатой среде (0,67% дрожжевого экстракта, 1% глюкозы, 0,2% D,L-метионина, 50 мг/л урацила) в течение 24 ч.

В работе использовали также генно-инженерные штаммы *E. coli* TG1 (supE hsdΔ5 thiΔ(lac-proAB) F'[traD36proAB⁺ lac^q lacZΔM15]) и BL21 (DE3) pLysS (F⁻ ompT hsdSe (г⁻vm⁻тв) gal dcm(DE3) pLysS), которые выращивали на стандартной 2YT среде (бактотриптон 16 г/л, дрожжевой экстракт 10 г/л и хлорид натрия 5 г/л). Для идентификации экспрессии DAAO штамм BL21 (DE3) pLysS с исследуемой плазмидой pKDAO1 выращивали при 25° в среде 2YT с аэрацией (200 об/мин) до достижения поглощения 0,6 на 600 нм (A₆₀₀ = 0,6). Далее в среду добавляли индуктор lac-промотора изопропил-тио-α-галактозид (IPTG) до конечной концентрации 0,5 мМ и инкубировали клетки при 25° и 200 об/мин еще в течение 5 ч.

Для клонирования гена *daao* из хромосомы проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с общей

* Государственный научный центр по антибиотикам, Москва.

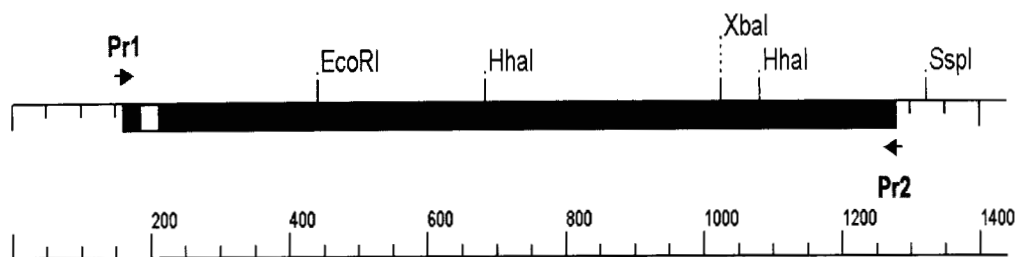


Рис. 1. Физическая карта гена *daao* из *T. variabilis*. Кодированная часть представлена темными прямоугольниками, светлый прямоугольник в начале гена – интрон (Pr1 и Pr2 – специфические праймеры для проведения ПЦР)

ДНК, выделенной из клеток *T. variabilis*. Препарат хромосомной ДНК получали при использовании реагента DNazol фирмы “Gibco” в соответствии с рекомендациями изготовителя. После предварительной денатурации матрицы при 95° в течение 5 мин проводили ПЦР, используя специфические праймеры Pr1 и Pr2 [9], комплементарные 5'- и 3'-концам гена соответственно, на термоциклере РНС2 фирмы “Techné” с помощью Pfu Turbo полимеразы (“Stratagene”) в фирменном буфере.

Pr1 5'-GCTGGATCCATGGCTAAAATCGTTGTTATTGG-3'

NcoI

Pr2 5'-CATGGATCCCTAAAGGTTTGGACGAGTAAGAGC-3'

BamHI

Реакцию проводили в два этапа: 5 циклов (1 мин при 95°, 1 мин при 48° и 2 мин при 72°), затем 30 циклов (1 мин при 95°, 1 мин при 54° и 2 мин при 72°).

Для клонирования гена *daao*, не содержащего интрона, получали кДНК. Препарат суммарной РНК из клеток *T. variabilis* выделяли с использованием набора NucleoSpin RNA II фирмы “Macherey-Nagel” в соответствии с рекомендациями изготовителя. Для получения кДНК гена *daao* проводили реакцию обратной транскрипции при 45° в течение 30 мин на свежесделанном препарате РНК с помощью AMV обратной транскриптазы (“Roche”) и специфического праймера Pr2 [9], комплементарного 3'-концу мРНК гена *daao*. Реакцию останавливали прогреванием реакционной смеси при 95°.

После предварительной денатурации кДНК матрицы при 95° в течение 5 мин проводили ПЦР в условиях, аналогичных проведению ПЦР с хромосомной ДНК, выделенной из клеток *T. variabilis*.

ПЦР-продукты обрабатывали рестриктазами *NcoI* и *BamHI* по фланкирующим ген рестриктным сайтам и клонировали в плазмиду рЕТ23d (“Novagen”), обработанную теми же рестриктазами. Для анализа полученных рекомбинантных плазмид использовали не менее восьми клонов каждой плазмидной конструкции.

Секвенирование ДНК проводили по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе ДНК фирмы “Perkin Elmer Applied Biosystems” (модель 370 А) с помощью секвенирующего набора “ABI PRISM” DNA Sequencing

Kit с использованием Taq-полимеразы и флуоресцентно меченых терминаторов.

Результаты и их обсуждение

Анализ нуклеотидной последовательности гена *daao* из *T. variabilis* показывает, что первичный транскрипт состоит из 1106 нуклеотидов и содержит один интрон из 38 нуклеотидов вблизи 5'-конца гена [8] (рис. 1). Так как ген *daao* содержит интрон, для осуществления экспрессии оксидазы D-аминокислот в *E. coli* было необходимо использовать ген, полученный на основе кДНК. РНК выделяли из культуры клеток *T. variabilis*, выращенных в оптимальных для продуцирования оксидазы D-аминокислот условиях, и содержащих поэтому относительно высокое количество мРНК гена *daao*. После транскрипции мРНК гена *daao* полученная кДНК была амплифицирована с помощью ПЦР. По результатам электрофореза, приведенным на рис. 2 (трек 1), видно, что продуктом этой реакции является

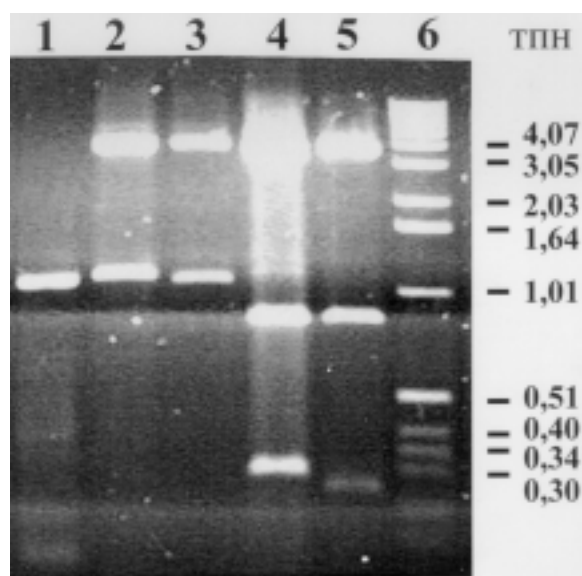


Рис. 2. Рестрикционный анализ плазмид рDAO и рKDAO1. Трек 1 – ген *daao*, полученный в результате транскрипции мРНК и последующей амплификации с помощью ПЦР; треки 2 и 3 – плазмиды рDAO и рKDAO1, обработанные рестриктазами *NcoI* и *BamHI*; треки 4 и 5 – плазмиды рDAO и рKDAO1, обработанные рестриктазами *NcoI* и *EcoRI*; трек 6 – маркеры молекулярной массы ДНК

один фрагмент ДНК размером около 1,1 тпн, что соответствует размерам гена *daao* (кДНК ген *daao* был клонирован в вектор рЕТ23d по рестриктным сайтам *NcoI* и *BamHI*, в результате чего была создана рекомбинантная плаزمид рKDAOI).

Для получения гена *daao*, содержащего интрон, проводили ПЦР на хромосомной ДНК *T. variabilis*, и полученный продукт также клонировали в вектор рЕТ23d по рестриктным сайтам *NcoI* и *BamHI*, в результате чего была создана рекомбинантная плазмид рDAO.

Для сравнительного анализа плазмид рDAO и рKDAOI, содержащих ген *daao* с интроном и без интрона соответственно, эти плазмиды расщепляли комбинацией двух рестриктаз – *EcoRI* (один сайт расположен внутри гена (рис. 1) и второй сайт в полилинкере рЕТ23d со стороны 3'-конца гена *daao*) + *NcoI* (сайт по которому проводили клонирование гена *daao*). Расщепление этими рестриктазами должно приводить к получению трех фрагментов. Из результатов электрофореза в агарозном геле (рис. 2) хорошо видно, что фрагмент *NcoI–EcoRI*, соответствующий началу гена, в плазмиде

рKDAOI легче, чем в плазмиде рDAO. Полученные данные свидетельствуют о том, что в плазмиде рKDAOI ген *daao* не содержит интрона. Последующее секвенирование генов *daao* из плазмид рKDAOI и рDAO не выявило отличий от известной последовательности этих генов.

Для идентификации продукта гена *daao* в клетках *E. coli* использовали систему экспрессии на основе РНК-полимеразы фага Т7. По результатам предварительных опытов удалось установить, что рекомбинантный штамм продуцирует белок с молекулярной массой 39 кДа, что находится в соответствии с молекулярной массой, предсказанной для DAAO белка (39,3 кДа).

Таким образом, в результате проделанной работы был клонирован ген оксидазы D-аминокислот из дрожжей *T. variabilis* и показана возможность его экспрессии в клетках *E. coli*. Дальнейшим направлением наших исследований будет оптимизация экспрессии гена *daao* в клетках *E. coli* и сравнение свойств рекомбинантного фермента с нативной оксидазой D-аминокислот.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sentheshanmuganathan S., Nickerson W.J.* // J. Gen. Microbiol. 1962. **27**. P. 465.
2. *Yoshizawa M., Veda M., Mozaffar S., Tanaka A.* // Agric. Biol. Chem. 1986. **50**. P. 2637.
3. *Simonetta M. P., Vanoni M.A., Curti B.* // FEMS Microbiol. Lett. 1982. **15**. P. 27.
4. *Pistorius E. K., Voss H.* // Biochim. Biophys. Acta. 1977. **481**. P. 395.
5. *Sikora L., Marzluf G. A.* // Mol. Gen. Genet. 1982. **186**. P. 186.
6. *Le Hir M., Dubach U.C.* // FEBS Lett. 1981. **127**. P. 250.
7. *Conlon H. D., Baqal J., Baker K. et al.* // Biotechnol. Bioeng. 1995. **46**. P. 510.
8. *Gonzalez F. J., Monies J., Martin F., et al.* // Yeast. 1997. **13**. P. 1399.
9. *Lin L.L., Chien H. R., Wang W.C. et al.* // Enzyme Microb. Technol. 2000. **27**. P. 482.

Поступила в редакцию 25.10.02