

УДК 579.66:579.254.2

К. А. Губчик, науч. сотр.; Р. Н. Бирюков, науч. сотр.;
И. С. Сурдол, мл. науч. сотр.; И. С. Казловский, науч. сотр.
(Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск);
А. А. Костеневич, канд. биол. наук, доц. (БГТУ, г. Минск)

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА, СОДЕРЖАЩЕГО ГЕН БЕТА-1,3-N-АЦЕТИЛГЛЮКОЗАМИН-ТРАНСФЕРАЗЫ И ОПТИМИЗАЦИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ ЕГО ЭКСПРЕССИИ

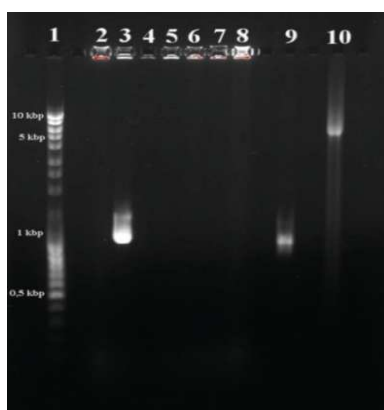
Олигосахариды грудного молока (далее ОГМ) играют важную роль в развитии ребенка в период грудного вскармливания, проявляя пребиотическую, противоинфекционную, противовоспалительную, иммуностимулирующую и др. активности. Олигосахариды – третий основной компонент грудного молока человека после лактозы и липидов [1, 2]. Синтез ОГМ осуществляется в ацинарных клетках молочной железы гликозидазами и гликозилтрансферазами путем удлинения молекулы лактозы мономерами D-глюкозы, D-галактозы (Gal), N-ацетилглюкозамина, L-фукозы и N-ацетилнейраминовой кислоты [2].

В настоящее время для исследования и поиска применения ОГМ в качестве продуктов функционального питания разрабатываются эффективные способы их синтеза (химический, ферментативный, микробный), среди которых наиболее перспективные: биотрансформация целых клеток, создание генно-инженерных микробных штаммов-продуцентов [1, 2, 3]. В человеческом молоке преобладают олигосахариды, получаемые путем удлинения молекулы одного из основных ОГМ – лакто-N-триозы II (LNT2), являющегося структурным предшественником лакто-N-тетраозы и лакто-N-неотетраозы, которые в свою очередь выступают субстратом для синтеза ~ 50-70 % ОГМ, составляющих 0,5-1,5 г/л в молоке. LNT2 синтезируется путем присоединения активированного остатка N-ацетилглюкозамина к остатку Gal β -лактозы под действием β -N-ацетилглюкозамин-трансферазы [2, 3].

Цель работы – создать рекомбинантный штамма-продуцент β -1,3-N-ацетилглюкозамин-трансферазы (β -1,3-N-AGAT), а также исследовать оптимальные условия индукции экспрессии целевого гена.

Для конструирования микробного штамма-продуцента β -1,3-N-AGAT использовали последовательность целевого гена *ybt1518_rs29990* [*Bacillus thuringiensis* YBT-1518] (981 bp) из базы данных NCBI (банка генов). В нашем исследовании донором хромосомной ДНК, содержащей целевой ген, служил штамм *B. thuringiensis* ВІМ В-180 из коллекции непатогенных микроорганизмов Института

микробиологии НАН Беларуси. Праймеры для амплификации целевого гена методом ПЦР конструировали с использованием программного обеспечения SnapGeneViewer 1.4.1., учитывая дополнительные последовательности необходимые для встраивания в векторную плазмиду. Для встраивания методом прямой перекрывающейся ПЦР (ПП-ПЦР), переноса и экспрессии целевого гена применяли мультикопийную плазмиду рЕТ42а(+). После амплификации целевого гена и ПП-ПЦР проводили трансформацию штамма-реципиента *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Invitrogene, USA) полученным конкатемером и выполняли скрининг позитивных клонов (*E. coli* BL21.Bt1), наследующих плазмиду со вставной целевого гена, методом ПЦР (рисунок 1).



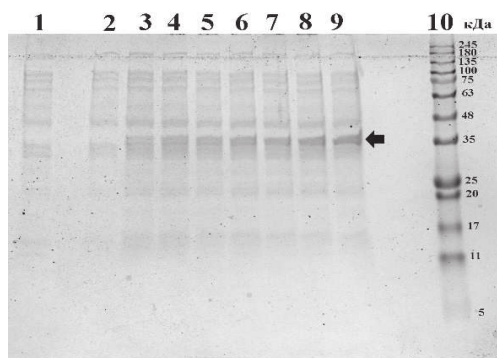
1 – молекулярный маркер MassRuler DNA Ladder Mix;
 2-8 – продукты ПЦР-скрининга; 9 – ПЦР продукт амплификации гена;
 10 – ПЦР продукт амплификации плазмиды

Рисунок 1 – Электрофореграмма ПЦР продуктов амплификации целевого гена β -1,3-N-AGAT, линейризованной плазмиды рЕТ42а(+) и продуктов ПЦР-скрининга

Основное преимущество использования *E. coli* в качестве штамма-продуцента рекомбинантных белков – хорошие кинетические показатели роста культуры клеток на относительно простых питательных средах, типа Luria-Bertani (LB). Однако экспрессия рекомбинантного белка может создавать высокую метаболическую нагрузку на микроорганизм, вызывая значительное сокращение времени его генерации [4]. Поэтому на следующем этапе исследований проводили изучение влияния физико-химических параметров на экспрессию целевого гена при культивировании клона *E. coli* BL21.Bt1 в жидкой питательной среде LB: концентрация и компоненты питательной среды, температура инкубирования, рН среды, скорость вращения шейкера инкубатора.

Оптимальный выход β -1,3-N-AGAT (~41 мкг/мл) наблюдался по истечению 4 ч индукции экспрессии целевого гена 1 мМ изопропил- β -

D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ) при инкубировании *E. coli* BL21.Vt1 в среде LB (пептон – 1%, глюкоза – 1%, дрожжевой экстракт – 0,5%, NaCl – 0,25%, канамицин – 100 мкг/мл, pH 7,2), 20 °С, скорости вращения шейкера инкубатора – 200 об/мин (рисунок 2).



1 – до внесения ИПТГ; 2 – 5 мин после внесения ИПТГ; 3 – 1 ч; 4 – 2 ч; 5 – 3 ч; 6 – 4 ч; 7 – 5 ч; 8 – 6 ч; 9 – 24 ч после внесения ИПТГ; 10 – Маркер молекулярной массы BlueElf (PS-105)

Рисунок 2 – Электрофореграммы белкового состава клеток штамма *E. coli* BL21.Vt1 в результате оптимизации физико-химических условий культивирования во время индукции экспрессии гена β -1,3-N-AGAT

В результате проделанной работы был получен рекомбинантный штамм *E. coli* BL21.Vt1 и подобраны условия для достижения им оптимального выхода β -1,3-N-AGAT, фермента катализирующего синтез LNT2. Работа выполнена в рамках задания Б19М-047 БРФФИ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sprenger, G.A. Production of human milk oligosaccharides by enzymatic and whole-cell microbial biotransformations / G.A. Sprenger, F. Baumgärtner, C. Albermann // *Journal of Biotechnology*. – 2017. – Vol. 258 – P. 79-91.
2. Chen, X. Human Milk Oligosaccharides (HMOS) / X. Chen // *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. – Elsevier, 2015. – Vol. 72. – P. 113-190.
3. Biotechnological production of human milk oligosaccharides / N.S. Han [et al.] // *Biotechnology Advances*. – 2012. – Vol. 30, № 6. – P. 1268-1278.
4. Rosano, G.L. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges / G.L. Rosano, E.A. Ceccarelli // *Front. Microbiol.* – 2014. – T. 5.