REPORTS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN
ISSN 2224-5227
Volume 2, Number 306 (2016), 128 – 136

THERMOASCUS AURANTIACUS B-GLUCOSIDASE EXPRESSION IN S. CERVISIAE

Smekenov I.T[1]., Kuanbay A.K[2]., Buribaeva A.C[3]., Taipakova S.M[4]., Bissenbaev A.K[5].

Institute of Biology and Biotechnology Problems, al-Farabi Kazakh National University,
Almaty, Kazakhstan
Sabira.Taipakova@kaznu.kz; Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

Kew words: β-glucosidase, *Thermoascus aurantiacus*, *Saccharomyces cerevisiae* secretion, cellobiose, ethanol.

Abstract. By means of gene engineering methods, a recombinant plasmid YEGAp/alpha-*bglI*-flag was assembled. The vector carries β-glycosidase gene from *Thermoascus aurantiacus* with signal peptide of yeast α-factor and FLAG-tag. β-glycosidase cDNA was expressed in *S.cerevisiae* strain FF18733 under control of GAPDH promoter. The recombinant enzyme is secreted into culture medium and effectively digests cellobiose. Recombinant strain *S. cerevisiae* FF18733/YEGAp-α-*bglI*-flag is able to grow in medium where cellobiose acts as the only carbon source. The strain produces ethanol in cellobiose containing medium in quantities comparable to ethanol production by non-transformed yeast in medium with glucose.

УДК: 577.216.3, 577.218

ЭКСПРЕССИЯ кДНК β-ГЛЮКОЗИДАЗЫ ГРИБА THERMOASCUS AURANTIACUS B S. CERVISIAE

Смекенов И.Т[1]., Куанбай А.Қ[2]., Бурибаева А.С[3]., Тайпакова С.М[4]., Бисенбаев А.К[5].

ДГП «Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии»
КазНУ им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан
Sabira.Taipakova@kaznu.kz; Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

Ключевые слова: β-глюкозидаза, *Thermoascus aurantiacus, Saccharomyces cerevisiae*, секреция, целлобиоза, этанол.

Аннотация. С помощью генно-инженерных методов сконструирована рекомбинантная плазмида YEGAp/alpha-*bglI*-flag, включающий ген β-гликозидазы *bglI* гриба *Thermoascus aurantiacus* с сигнальным пептидом α-фактора дрожжей и flag-эпитопом. кДНК β-гликозидазы экспрессирован под контролем конститутивного промотора GAPDH в *S. cerevisiae* штамма FF18733. Показано, что рекомбинантный фермент секретируется в культуральную среду и эффективно расщепляют целлобиозу. Показано, что рекомбинантный штамм *S. cerevisiae* FF18733/YEGAp-α-*bglI*-flag обладает способностью к росту в среде с целлобиозой, добавленной в качестве единственного источника углеводородов. Выявлено, что рекомбинантный штамм в среде с целлобиозой производит этанол сравнимый с количеством этанола производимыми нетрансформированными клетками дрожжей в среде с глюкозой.

Введение. Биологическая переработка целлюлозы является важным для развития альтернативной энергетики [1-5]. Целлюлоза является наиболее распространенным биологическим полимером. Она представляет собой линейный полимер, D-гликопиранозные остатки которого связаны β-1,4-глюкозидными связями. В зависимости от растительного источника степень полимеризации нативной целлюлозы может составлять приблизительно от 10 тыс. (у древесины) до 15 тыс. (у хлопка) [6]. Эффективная деструкция целлюлозы до растворимых сахаров, обычно требует совместное действие трех типов ферментов: эндо-1,4-β-глюконазы (КФ 3.2.1.4), экзо-1,4-β-глюконазы (КФ 3.2.1.91) и 1,4-β гликозидазы (КФ 3.2.1.21) [2-5]. Эндо-1,4-β-глюканазы

гидролизует внутренние β-1,4-гликозидные связи, экзо-1,4-β-глюкозидазы (целлобиогидролазы) отщепляют целлобиозу с конца полимерных молекул нативной или частично гидролизованной целлюлозы и в свою очередь β-глюкозидазы расщепляет целлобиозу до глюкозы [7-9]. Эти ферменты известны как целлюлазы, которые проявляют синергизм для полного гидролиза целлюлозы до растворимых олигомерных и мономерных сахаров.

В настоящее время в качестве возможных продуцентов целлюлаз рассматриваются широкий спектр организмов, включая бактерий, грибы, насекомые и растения [10-12].

Среди микробных продуцентов целлюлаз сумчатые грибы *Thermoascus aurantiacus* играют ведущую роль. Грибы *Thermoascus aurantiacus* секретируют сложный набор целлюлитических ферментов и являются источником коммерческих целлюлитических препаратов, особенно в пищевой, текстильной и фармацевтической промышленности [13,14].

β-1,4-гликозидаза является основным компонентом целлюлазного комплекса. Эффективность образования глюкозы из целлобиозы и их последующее ферментация в этанол зависит от β-1,4-гликозидазы. Однако, большая часть охарактеризованных β-1,4-гликозидаз сильно чувствительны к глюкозе, т. е ингибируются конечным продуктом (глюкоза) по принципу обратной связи. В работе по биохимической характеристике β-1,4-гликозидаз грибов показано, что фермент, выделенный из *Thermoascus aurantiacus*, наибольшей эффективностью гидролизует целлобиозу и устойчив к действию глюкозы [15].

В настоящей работе ген β-1,4-гликозидазу *Thermoascus aurantiacus* (GenBank регистрационный номер DQ114397.1) клонирован под контроль конститутивного промотора глицероальдегид 3-фосфат дегидрогеназы (*GAPDH*) и оптимизирована экспрессия этого гена в *S. cerevisiae*. Показано, что полученный рекомбинантный штамм *S. cerevisiae* эффективно экспрессирует β-1,4-гликозидазу и ферментирует целлобиозу в этанол.

Материалы и методы

Материалы

Объектом исследования явились мицелии гриба *Thermoascus aurantiacus* семейства эуроциевых.

В ходе работы использовали клеточные линии: DH5α для наработки плазмидной ДНК, экспрессионный штамм FF 18733 *S. cerevisiae*, а так же экспрессионный вектор YEGAp. Культивирование клеток *S. cerevisiae* проводили при 30°C в богатой среде YPAD, скрининг трансформантов проводили на синтетической минимальной селективной среде, включающей глюкозу и смеси аминокислот (среда SD DO -TRP). Для приготовления буферных растворов использовали реактивы марок х.ч., ч.д.а., и о.с.ч., производимых фирмами «Sigma», «Amresco», «Applichem» и «Реахим». А так же в ходе работы использовали ферменты модификации ДНК и белков производства фирм «Sigma-Aldrich» (Германия), «New England Biolabs» (Франция), «Thermo Scientific» (Литва), «Promega» (США), «Roche» (США).

Таблица 1- Плазмиды использованные в данной работе

Плазмиды	Особенности	Источник
pMETalphaB	Сигнальный пептид (α-фактор)	Invitrogen
pBAD/gIII A	Myc-эпитоп, 6xHis•tag	Invitrogen
YEGAp	pGAPDH, tGAPDH	[16]
pESC-LEU2	pGAL10	Agilent
YEGAp/α-MCS-*myc-6xHis*		[17]

Электрофоретическое разделение белков в ДСН-ПААГ

Разделение белков по молекулярной массе проводили электрофорезом в полиакриламидном геле по методу Лэммли в денатурирующих условиях [18] .

Белковые образцы готовили кипячением в 2X буфере для образцов (2X:125мМ Tris-HCl pH

6.8, 10% β-меркаптоэтанола, 4% SDS, 0.02% бромфенолового синего, 20% глицерина) в течении 5 мин при 100°С. Далее 15 мкг образца белка нанесли на 5% концентрирующий гель и проводили концентрацию белков при 80V. Разделение белков осуществляли в 10% геле при 180V. В качестве электродного буфера использовали стандартный Трис-глициннный буфер pH 8.3 (25мМ Tris pH 8.3, 192мМ глицина, 0.1% SDS). После завершения электрофореза окрашивание гели проводили при комнатной температуре в растворе кумасси (50% метанол, 10% уксусная кислота, 0.25% Coomassie Blue R-250) в течении 1ч. Далее декантировали раствор для окрашивания и добавляли отмывочный раствор (10% метанол, 5% уксусная кислота). Гель отмывали, легко взбалтывая и помешивая жидкость до тех пор, пока зоны, свободные от белков, не станут прозрачными.

Методы определения активности ферментов

Трансформированные клетки культивировали в течение ночи в 20 мл минимальной селективной среды SD DO -TRP. Затем ночную культуру инокулировали в 1000 мл свежей среды и культивировали при 30 °С в течение 3 суток. Клетки собирали центрифугированием в течение 7 мин при 3000 x *g*, 20°С. Клетки ресуспендировали в 50мМ натрий-фосфатном буфере и гомогенизировали вортексированием при максимальной скорости с добавлением обработанных кислотой стекляных бусинок диаметром 0,45мм. Клеточный лизат центифугировали при 14000 x *g* в течение 30 мин. Культуральную жидкость использовали в качестве источника β-глюкозидаз. Содержание белка в образцах определяли по методу Бредфорда [19], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (БСА).

Определение активности ферментов по отношению к n-нитрофенильным производным сахаров

Ферментативную активность по отношению к *n*-нитрофенильному производному сахаров *n*-нитрофенил β-D-целлобиозиду (pNP-Cell) определяли в pH-оптимуме действия фермента при концентрации субстрата 8мМ и оптимальной температуре. 400 мкл смеси, содержащего 50мМ натрий-фосфатного буфера с pH-оптимумом действия фермента, 8мМ pNP-Cell или pNP-Lac прогревали при оптимальной температуре в течении 5 мин, и далее ферментативную реакцию начинали путем внесения 0,1мл предварительно разбавленного и подогретого таким же образом раствора фермента. Инкубацию реакционной смеси проводили в течение 1 часа. Затем реакцию останавливали путем добавления 2 мл 1М Na_2CO_3. Поглощение раствора измеряли на спектрофотометре на длине волны 420 нм относительно контрольного раствора приготовленного таким же образом, но без фермента. Количество выделившегося *n*-нитрофенила рассчитывали с использованием его коэфицента экстинции, и далее рассчитывали ферментативную активность. За единицу активности принимали количество фермента, которое приводит к образованию 1мкМ *n*-нитрофенола (pNP) из субстрата за 1мин на мг тотального белка при данных условиях реакции.

Определение выхода этанола

Для определения выхода этанола дрожжевые культуры были выращены в SD-Trp средах, содержащих 20 г/л глюкозы, 20 г/л целлобиозы или 20 г/л глюкозы + 20 г/л целлобиозы, в течение 5 дней в анаэробных условиях. Концентрацию этанола измеряли спектрофотометрически при длине волны 340 нм каждые 12 часов с момента посева клеток. Изначально в кюветы залили 2 мл дистилированной воды, сверху добавили 100 мкл образца, при этом каждый раз прикрывая кюветы крышками во избежание испарения этанола. После последовательно в каждую кювету залили по 200 мкл "solution 1 (buffer)", 200 мкл "solution 2 (NAD+)", 50 мкл "solution 3 (Aldehyde dehydrogenase)" и хорошо перемешав, инкубировали при 20-25°С приблизительно 2 минуты, после чего измеряли абсорбцию (A1). Получив значения A1, к реакционной смеси добавили второй фермент "suspension 4 (Alcohol dehydrogenase)", и хорошо перемешав, инкубировали при 20-25°С приблизительно 5-10 минут, после чего измеряли абсорбцию (A2). Полученные данные обрабатывали с помощью онлайн калькулятора Mega-CALC™.

Результаты и их обсуждения

Для выделения гена кодирующей β-1,4-гликозидазы *Thermoascus aurantiacus* нами были

конструированы две олигонуклеотидных праймера на основе данных о первичной структуре кДНК β-1,4-гликозидазы *T. aurantiacus*, имеющихся в электронной базе данных GenBank (GenBank регистрационный номер DQ114397.1) [20]. Последовательности этих олигонуклеотидных праймеров следующее: смысловой праймер *bgl1* Dir: 5'-aaAAGCTTCATATGAAGGATGACTTGGCC-3' и *bgl1 Rev*: 5'- aaGGATCCACTAGTCCGTAA

GGGGGAAGCGG-3'. Подчеркнутые нуклеотиды соответствуют сайтам рестрикции *Hind*III, *Nde*I и *BamH*I, *Spe*I, соответственно. В результате был амплифицирован один фрагмент ДНК размером около около 2500 п.н. ПЦР-продукты обрабатывали рестриктазами *Nde*I и *BamH*I по фланкирующим ген сайтам рестрикции и клонировали в обработанный теми же рестриктазами вектор pET32a под контроль промотора бактериофага T7. Полученный рекомбинантный вектор - pET32a/*bgl1* - трансформировали в *E.coli*. Клоны были секвенированы в обоих направлениях. Секвенирование нуклеотидной последовательности клонированного гена *bgl1* показало полное совпадение с нуклеотидной последовательностью *bgl1 Thermoascus aurantiacus*, опубликованной ранее [20]. Для подтверждения того, что ген *bgl1,* кодирует β-1,4-гликозидазу, мы использовали экспресионный штамм *E.coli*. Rosetta(DE3). Экспрессию гена *bgl1* в трансформированных клетках выявляли с помощью ДСН-ПААГ электрофореза. Данные ДСН-ПААГ электрофореза показали белковые полосы с молекулярной массой 96,9 кДа, что соответствует рассчитанной молекулярной массе BGL1. Аналогичная белковая полоса не обнаруживалась в экстрактах клеток, несущих pET32a без вставки.

Для создания дрожжевого интегрального вектора с промотором глицероальдегид-дифосфат дегидрогеназы (GAPD), сигнальным пептидом α-фактора дрожжей и гистидиновым тэгом нами были использованы несколько плазмидных векторов в качестве источников сигнального пептида, flag-эпитопа и 6xHis тэга (таблица 1). В первоначальных экспериментах мы клонировали кДНК ген *bgl1*в плазмидный дрожжевой вектор pESC-LEU2 (рисунок 1). pESC-LEU2 вектор мы использовали в качестве источника flag-эпитопа. Для этого, плазмиду pET32a/*bgl1* рестрицировали по сайту HindIII и обработали фрагментом Кленова для получения тупых концов. Затем полученный фрагмент кДНК гена *bgl1* рестрицировали по сайту SpeI и клонировали в корпус вектора pESC-LEU2.

Необходимо отметить, что pESC-LEU2 вектор был предварительно рестрицирован по *Not*I и обработан фрагментом Кленова для получения тупого конца с одной стороны, с другой стороны рестрицирован по *Spe*I. В результате чего была получена рекомбинантная плазмида pESC-LEU2/*bgl1*-flag с кДНК геном *bgl* слитый с последовательностью flag-эпитопа на 3'-конце. Далее pESC-LEU2/*bgl1*-flag обработали по сайтам рестрикции *Nde*I и *Pac*I и фрагмент длиной 2577 пар нуклеотидов, соответствующий длине кДНК *bgl1* с последовательностью flag-эпитопа на 3'-конце, вырезали из агарозного геля, элюировали и лигировали в созданную нами YEGAp/α-MCS-6xHis вектор, предварительно обработанной по тем же сайтам рестрикции (рисунок 1). Данный вектор содержит дрожжевой конститутивный промотор гена GAPDH. Кроме этого вектор YEpGAp содержит ген *TRP1* для селекции трансформированных клеток, а также с сигнальный пептид α-фактора дрожжей и гистидиновый тэг (6xHis). Продукты лигирования были трансформированы в хемикомпетентные клетки *E.coli* штамма DH5α.

Трансформированные клетки, несущие вектор со вставкой, были выявлены по устойчивости к ампицилину. Плазмидная ДНК, выделенная из отобранных клеток, была проверена на наличие вставки методом ПЦР и рестрикционного анализа. Результаты рестрикционного и ПЦР анализа плазмиды представлены на рисунке 2. Как видно из рисунка 2А, плазмиды выделенные из клеток *E. coli,* трансформированных рекомбинантным YEGAp/α-*bglI*-flag, при обработке эндонуклеазами рестрикции *EcoR*I и *Pac*I, на 0,8% агарозном геле дают четко выраженные две полосы с длиной 7 т.п.н. и 3 т.п.н.. Первая из полос соответствовала длине плазмиды YEGAp без вставки, а вторая длине рекомбинантной конструкции α-*bgl*I-flag.

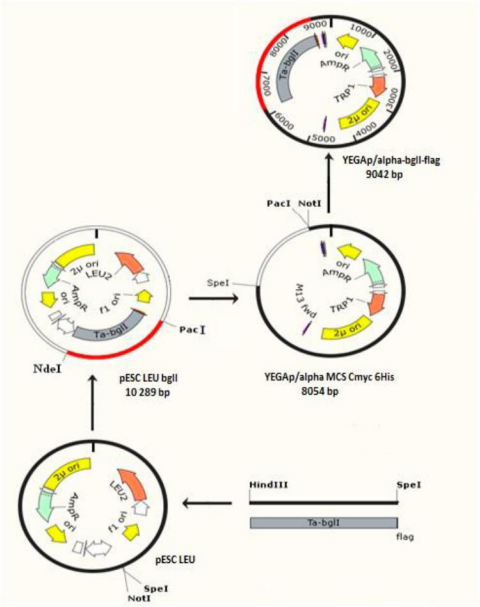
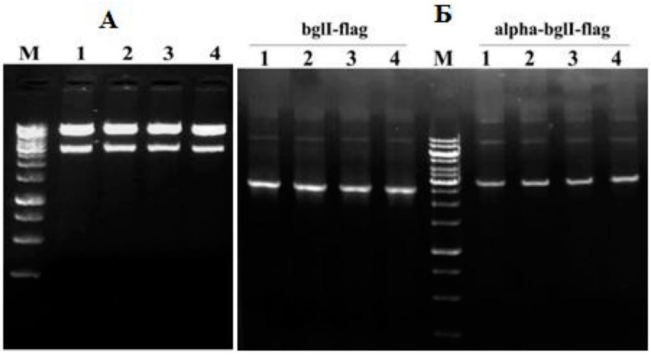


Рисунок 1 - Схема конструкции рекомбинантной плазмиды YEGAp/alpha-*bglI*-flag с кДНК геном *bgl1* слитый с сигнальным пептидом α-фактора дрожжей и flag эпитопом

Также нами был проведен ПЦР анализ с использованием ген специфических праймеров и плазмидных ДНК, выделенных из трансформантов, в качестве матрицы. Фрагменты, обнаруженные в результате агарозного гель - электрофореза полностью соответствовали длине клонированного кДНК гена *bglI* и конструкции α -*bglI*-flag (рисунок 2Б)



А - Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды YEGAp/ α-*bglI*-flag; Б - ПЦР анализ рекомбинантной плазмиды YEGAp/α-*bglI*-flag. М- ДНК маркер; 1 - 4 клоны.

Рисунок 2 - Анализ клонов, трансформированных YEGAp/α-*bglI*-flag штаммов *E.coli* на наличие рекомбинантной плазмиды

Таким образом, эти данные указывают на то, что проанализированные колонии содержат плазмиды, несущие соответствующую конструкцию. В результате проведенных анализов нами были идентифицированы четыре клонов, несущих рекомбинантную плазмиду. Вставленные фрагменты были проверены на отсутствие мутаций секвенированием.

Несмотря на то, что последовательности аминокислот, установленные на основе нуклеотидной последовательности, полностью соответствовали клонированному нами bglI было необходимо продемонстрировать, кодирует ли на самом деле этот ген β-гликозидазу.

Для анализа экспрессии β-гликозидаз в дрожжевой системе под контролем конститутивного GAPD промотора, YEGAp/α-*bglI*-flag вектор трансформировали в *S. cerevisiae* штамм FF 18733. Скрининг трансформантов проводили на селективной среде SD DO TRP supplement. В результате селекции было получено более двадцати колоний, из которых было отобрано три индивидуальных клонов. Отобранные трансформанты выращивали в 20 мл жидкой минимальной среды, в течение ночи при 30 ºС. Ночную культуру переносили в большой объем минимальной среды и растили при