

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОВ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗ БАКТЕРИЙ ШТАММА *E. faecalis* БИМ В-1012**  
**MOLECULAR GENETIC ORGANIZATION OF GENES LACTATE-DEHYDROGENASE OF STRAIN *E. faecalis* BIM B-1012**

*Алексей Викторович Лагодич, Андрей Иосифович Буко, Анастасия Михайловна Галкина, Алина Эдуардовна Наронская, Мария Юрьевна Шонина, Наталья Павловна Максимова, Виталий Анатольевич Щетко, Наталья Алексеевна Голознева*

Минск, Республика Беларусь

Ключевые слова: молочная кислота, лактатдегидрогеназа 1-го и 2-го типов, *Enterococcus faecalis*, амплификация, ПДРФ-анализ, сиквенс-анализ.

Резюме. Осуществлен биоинформационный анализ нуклеотидной последовательности генома различных представителей рода *Enterococcus* на наличие генов лактатдегидрогеназ. Из представленных в базах нуклеотидных последовательностей отсекинированных штаммов *E. faecalis* были выявлены два гена, кодирующие L-лактатдегидрогеназы (ЛДГ), относящиеся к двум типам. Для штамма *E. faecalis* БИМ В-1012 были получены продукты амплификации генов лактатдегидрогеназы интактного и мутагенизированных вариантов штамма. Последовательности генов L-ЛДГ были верифицированы посредством ПЦР-ПДРФ и сиквенс-анализа. Для гена L-ЛДГ1 выявлено новое аллельное состояние гена.

Keywords: lactic acid, lactate dehydrogenase type 1 and 2, *Enterococcus faecalis*, amplification, RFLP-analysis, sequence-analysis.

Summary. Bioinformatic analysis of the nucleotide sequence of the genome of various strains of the genus *Enterococcus* on the presence of lactate dehydrogenase genes have been performed. Two types of gene sequences encoding L-lactate dehydrogenase belonging to two types were identified based on genomic analysis of nucleotide sequences of *E. faecalis* strains. For intact strains *E. faecalis* BIM B-1012 and the mutagenized strain variants LDH gene amplification products were obtained. Sequences of L-lactate dehydrogenase gene were verified by PCR-RFLP and sequence analysis. A new gene allele status of the gene L-lactate dehydrogenase first type have been identified.

*Введение.* Традиционно в производстве молочной кислоты используют палочковидные формы молочнокислых бактерий. Однако помимо лактобацилл, для микробиологического синтеза лактатов часто используют штаммы лактококков, энтерококков и других представителей [1, 1, 3].

Продуктивность промышленных штаммов молочнокислых бактерий в оптимизированных условиях составляет от 2 до 57 г/л·ч·с выходом продукта от 22-26 до 92-120 г/л. Повышение эффективности микробиологического синтеза молочной кислоты обеспечивается совершенствованием технологического процесса и использованием генетически модифицированных штаммов-продуцентов. Штаммы *E. faecalis* обладают хорошим потенциалом. Они

ферментируют мелассу без ее предварительной обработки, при этом содержание L-изомера составляет 97-98 % [4]. Одним из преимуществ использования штаммов молочнокислых бактерий для промышленного получения молочной кислоты является отсутствие побочных продуктов метаболизма.

Наряду с выделением природных штаммов бактерий, способных эффективно продуцировать целевой продукт, актуальным является улучшение свойств имеющихся культур [5, 6].

Современные методы генетической инженерии позволяют получить высокоэффективные штаммы-продуценты молочной кислоты путем улучшения метаболизма природных штаммов, что невозможно, без детального изучения структуры и функции ключевых ферментов метаболического пути. В случае синтеза молочной кислоты таким мишенями являются лактатдегидрогеназы.

*Материалы и методы.* В работе использовали бактериальный штамм *E. faecalis* БИМ В-1012 из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов (Институт микробиологии НАН Беларуси) и его кислотоустойчивые варианты, полученные в результате химического мутагенеза.

Бактериальные культуры выращивали в жидких и на плотных питательных средах СМКБ, MRS и M17. Агаризованные среды содержали 1,5 % агара. Для получения препаратов хромосомной ДНК использовали фенол-хлороформную экстракцию. Для полимеразной цепной реакции использовали 1 мкл (50 нг) препарата ДНК.

Электрофоретический анализ ДНК осуществляли общепринятыми методами, приведенными в руководстве J. Sambrook et al. [7]. Для визуализации фрагментов ДНК использовали бромистый этидий в конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Для нанесения проб использовали буфер следующего состава: 40 % сахараза, 0,25 % бромфеноловый синий. Гель фотографировали, используя систему документации Infinity ST5 (Vilber Lourmat).

Размер фрагментов ДНК устанавливали на основании их электрофоретической подвижности в агарозном геле, в качестве реперной ДНК использовали GeneRuler™ 1kb DNA Ladder или GeneRuler™ 100bp DNA Ladder производства «ThermoScientific».

Определение концентрации ДНК осуществляли с использованием компьютерной программы ImageQuant Solutions v5.2, в качестве реперной ДНК использовали GeneRuler™ 1kb DNA Ladder или GeneRuler™ 100bp DNA Ladder производства «ThermoScientific».

Обработку препаратов ДНК РНК-азой проводили на этапах выделения и(или) непосредственно перед рестрикцией. Рестрикцию плазмидной ДНК осуществляли в условиях, рекомендуемых фирмой изготовителем «ThermoScientific» или «Jena Bioscience». Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием реактивов производства «ThermoScientific» и «Праймтех» (Беларусь). Выделение ДНК из агарозного геля осуществляли с помощью набора реагентов Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit.

Для реакции секвенирования ДНК использовали набор CycleReader™ Auto DNA Sequencing Kit производства MBI Fermentas (Thermo Scientific). Сиквенс ДНК осуществляли с помощью автоматического секвенатора (ALFexpress II). Результаты анализировали с использованием компьютерных программ ALFwin™ Sequence Analyser (version 2.10), программ BLASTP2.2.1 (сайт: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>); SQ-Biosequence Editor; ClustalW2 (сайт: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

*Результаты и обсуждение.* Получение, верификация и общая характеристика структурных элементов генов L-лактатдегидрогеназ штамма *E. faecalis* БИМ В-1012. Для разработки праймеров были проанализированы нуклеотидные последовательности генов L-ЛДГ у различных штаммов *E. faecalis*, геномы которых представлены в базе NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Это позволило выявить наличие двух копий генов L-ЛДГ, которые можно разделить на два типа, различающихся как по локализации в геноме, так и по протяженности.

С использованием метода множественного выравнивания была построена консенсусная последовательность для каждого из выявленных типов генов L-ЛДГ, с помощью которой были установлены их консервативные и варибельные области. Также было обнаружено, что концевые участки сходны у генов, принадлежащих к одной группе, что позволило разработать специфические праймеры для амплификации генов ЛДГ первого и второго типов. Длина ожидаемого продукта амплификации составляла 1013 и 983 п.н. при общей протяженности открытой рамки считывания генов ЛДГ1 — 984 п.н., а гена ЛДГ2 — 954 п.н. Последовательности праймеров, использованных в работе: EF-L1-F 5' — **aaggaggaagcaggt ATG ACT GCA GCC GCA GGG AAT AAA**– 3'; EF-L1-R 5' — **gacacgcacgaggt TTA TTT TGC TTC TTC TGC TTC AAA TTT AGC** — 3'; EF-L2-F 5' — **aaggaggaagcaggtATGAAAGTATTTAACAATAAAGTCGC**– 3'; EF-L2-R 5' — **gacacgcacgaggt СТАAGCGTT CGGTTGTAACGA** — 3'.

ПЦР проводили в два этапа с использованием температурного инкремента на стадии отжига праймеров (15 циклов):

94 °С	5 мин	1 цикл	общая денатурация
94°С	30 сек		денатурация
64-56 °С	30 сек	15 циклов	посадка праймеров*
68 °С	2 мин 10 сек		полимеризация
94°С	30 сек		денатурация
60 °С	30 сек	20 циклов	посадка праймеров*
72 °С	2 мин 10 сек		полимеризация
72 °С	10 мин	1 цикл	досинтез
4 °С	удержание		

\* — для амплификации гена лактатдегидрогеназы 2-го типа указанные значения температуры были снижены на 4 °С.

Для изучения полиморфизма генов был осуществлен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов L-лактатдегидрогеназ у различных штаммов *E. faecalis*. В таблице 1 приведены данные о точках по-

лиморфизма, ID штамма (согласно классификации базы данных NCBI), у которого имеется нуклеотидная замена в указанной позиции и ее фенотипическое проявление.

Таблица 1

Выявленные точки полиморфизма генов  
L-лактатдегидрогеназ бактерий *E. faecalis*

№ п/п	Позиция в консенсусной последовательности	Идентификационный номер штамма	Позиция в гене	Дикий тип	Ал-лель	Замена АК
<b>L-лактатдегидрогеназы-1 типа</b>						
1	258	13345472	258	T	C	Gly-Gly
2	504	13345472	504	T	C	Asp-Asp
3	540	13345472	540	G	T	Gly-Gly
4	781	14184680	781	T	C	Leu-Leu
<b>L-лактатдегидрогеназы-2 типа</b>						
1	60	14184922	60	T	C	Ile-Ile
2	160	14184922	160	G	A	Val-Met
3	246	14184922	246	C	T	Gly-Gly
4	357	12289589	357	G	A	Val-Val
5	396	12291433	396	T	C	Ala-Ala

Для L-ЛДГ1 были найдены специфичные рестриктазы, способные селективно разрезать полиморфный участок ДНК только при наличии определенного нуклеотида в точке полиморфизма, и соответственно выявлять полиморфную аллель анализируемого гена. В результате проведения ПДРФ-анализа с использованием рестриктаз MluI и SspI были получены рестрикции-профили, отличные от ожидаемых, предсказанных по консенсусной последовательности гена L-ЛДГ1. Полученные данные свидетельствуют о том, что последовательность гена ЛДГ1 исследуемого штамма отличается от описанных в базах данных, что позволяет говорить о выявлении нового аллеля анализируемого гена.

Интересным является факт сходства рестрикционных профилей, полученных с использованием проанализированных рестриктаз AluI, MspI, XceI, DraI, SmaI, HaeIII, Tsp509I, TaqI, NotI, ScaI у всех проанализированных форм с профилем гена L-ЛДГ2 исходного штамма и типовой консенсусной последовательности, составленной на основе нуклеотидных последовательностей четырех штаммов *E. faecalis* из базы NCBI.

С помощью рестриктазы EcoRI удалось выявить отличие в организации нуклеотидной последовательности гена ЛДГ2 у интактного и мутантного варианта штамма. Нуклеотидная последовательность мутанта 4 *Enterococcus faecalis* БИМ-В 1012 имеет дополнительный сайт рестрикции по EcoRI.

Поскольку ПДРФ-анализ не может дать целостного представления о нуклеотидной последовательности целевого гена как у мутантных форм так и у исходного штамма, было осуществлено секвенирование полученных продуктов амплификации указанных генов с целью выявления их возможных мутационных изменений. Для этого были сконструированы праймеры, поз-

воляющие осуществлять сиквенсную реакцию непосредственно с продукта амплификации либо после его предварительного клонирования в состав векторной конструкции pDG148-StuI [8]. Последовательность праймеров представлена ниже: LDG\_seqF 5'– (Cy5.5)AAGGAGGAAGCAG GTA–3'; LDG\_seqR 5'–(Cy5.5) GACACGCACGAGGT– 3'.

В результате анализа первичных данных и последующего редактирования полученных нуклеотидных последовательностей определены нуклеотидные последовательности для гена L-ЛДГ2 и частично для мутантов М4, М5 и М6. Последующий анализ полученных последовательностей с использованием аппаратных средств программ BLASTP2.2.1 (сайт: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), и ClustalW2 (сайт: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) позволил идентифицировать отсекуенные последовательности как гены L-ЛДГ 2-типа, характерные для представителей *E. faecalis* (уровень идентичности более 95-99 %).

Таким образом была выяснена первичная структурная организация гена L-лактатдегидрогеназы 2-го типа штамма *E. faecalis* БИМ В-1012.

С использованием алгоритма множественного выравнивания, было продемонстрировано, что общая структура гена L-ЛДГ2 штамма *E. faecalis* БИМ В-1012 имеет типичное строение для лактатдегидрогеназ *E. faecalis*, последовательности которых представлены в интегрированных и специализированных базах данных, и представлена 2-мя доменами: НАД-связывающий домен на N-терминальном конце и гликозид-гидролазный домен, расположенный со стороны С-конца. Так же в центральной области молекулы обнаруживается характерный для всех дегидрогеназ активный сайт — акцептор протонов.

Выявленная общность строения L-ЛДГ2 штамма *E. faecalis* БИМ В-1012 с таковыми других представителей вида позволяет предположить ожидаемое сходство в организации и L-ЛДГ1. Детальный сравнительный анализ L-ЛДГ1 и L-ЛДГ2 позволяет говорить как о сходстве в организации активного центра, так и общей организации и расположению функционально-значимых сайтов, а также демонстрирует существенные отличия между лактатдегидрогеназами обоих типов. Выявляемая идентичность по аминокислотному составу составляет только около 44 %.

Тем не менее, несмотря на общность первичной структуры двух белковых молекул, для них предсказывается различная пространственная организация функционально-активной молекулы. Так, для L-ЛДГ1 предпочтительной является структура тетрамера, тогда как для L-ЛДГ2 предпочтительной является форма димера (рис. 1), что может косвенно указывать на наличие альтернативных механизмов регуляции активности лактатдегидрогеназ.

#### Заключение.

1. Для штамма *E. faecalis* БИМ В-1012 и его мутантных вариантов получены продукты амплификации генов лактатдегидрогеназ, которые были верифицированы посредством ПДРФ- и сиквенс-анализа.

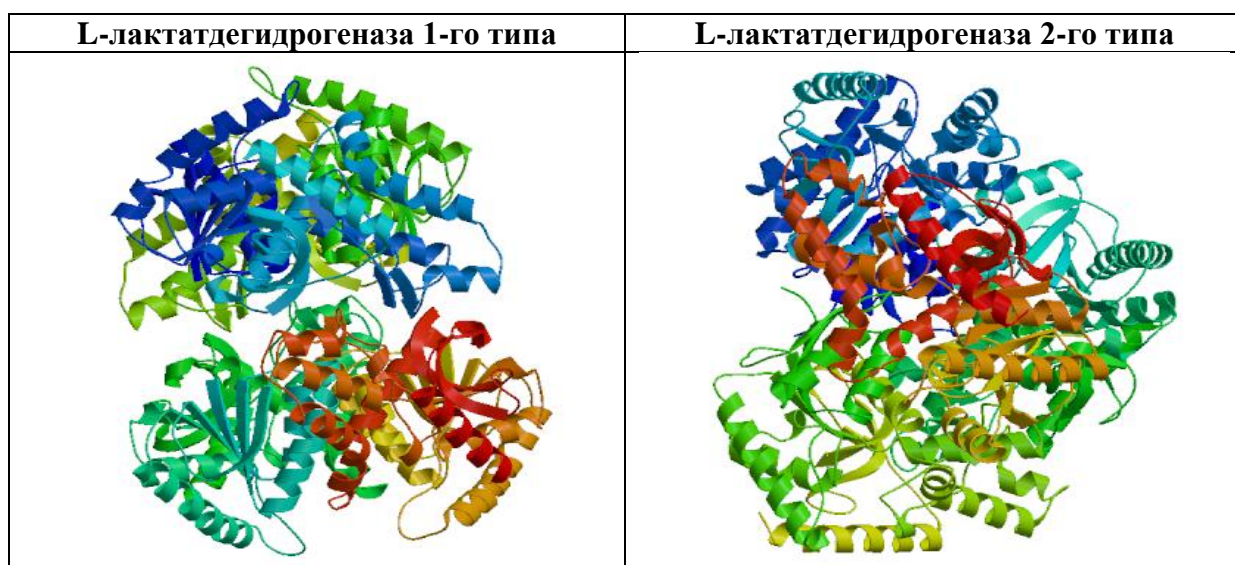


Рисунок 1. Пространственная организация L-лактатдегидрогеназ 1-го и 2-го типа бактерий *E. faecalis* (данные получены с использованием консенсусных последовательностей и ресурса: <http://www.uniprot.org/uniprot/>)

2. По результатам ПДРФ анализа было выявлено новое аллельное состояние гена L-ЛДГ 1-го типа, характеризующиеся отличным электрофоретическим профилем при использовании рестриктаз MluI и SspI.

3. Отличий в организации гена L-ЛДГ2 у исходного штамма *E. faecalis* БИМ В-1012 в сравнении с базами данных не выявлено. Для кислотоустойчивого варианта штамма *E. faecalis* БИМ В-1012 М4 показано изменение нуклеотидной последовательности гена ЛДГ2, выявляемое при помощи рестриктазы EcoRI.

4. Для L-ЛДГ 1-го типа предпочтительной является структура тетрамера, тогда как для L-ЛДГ 2-го типа предпочтительной является форма димера.

#### Список использованной литературы

1. Roble, N.D. L-lactic acid production from raw cassava starch in a circulating loop bioreactor with cell immobilized in loofa (*Luffa cylindrica*) / N.D. Roble, J.C. Ogbonna, H. Tanaka // *Biotechnol. Lett.* — 2003. — Vol. 25. — P. 1093–1098.

2. Исакова, Д.М. Способ получения молочной кислоты / Д.М.Исакова // Патенты России (База патентов на изобретения РФ) [Электронный ресурс]. — 2001. — Режим доступа: <http://ru-patent.info/21/75-79/2175014.html>. — Дата доступа: 20.03.2015.

3. Галкина, Г.В. Штамм бактерий *Enterococcus faecium* В-2240 D — продуцент оптически чистой L(+)-молочной кислоты и промышленный способ получения L(+)-молочной кислоты или ее солей / Г.В. Галкина, В.И. Илларионова // Регистр интеллектуальной промышленной собственности [Электронный ресурс]. — 2003. — Режим доступа: <http://bd.patent.su/2205000-2205999/pat/servlet/servlet5298.html>. — Дата доступа: 20.03.2015.

4. Wee, Y-J. Biotechnological production of Lactic Acid / Y-J. Wee, J-N. Kim, H-W. Ryu // Food Technol. Biotechnol. — 2006. — Vol. 44. — № 2. — P. 163–172.
5. The US corn ethanol industry: an overview of current technology and future prospects / B.S. Dien [et al.] // Int Sugar J. — 2002. — Vol. 104. — P. 204–211.
6. Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for production of pure l-(+)-lactic acid / K. Kylä-Nikkilä [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 2000. — Vol. 66. — P. 3835–3841.
7. Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. / J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Publications, NY. — 1989. — 468 p.
8. Rapid orientated cloning in a shuttle vector allowing modulated gene expression in *Bacillus subtilis* / P. Joseph [et al.] // FEMS Microbiol. Lett. — 2001. — Vol. 205. — P. 91–97.