

УДК 579.22+579.6+577.152.1

ПОЛУЧЕНИЕ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ЛАКТАТОКСИДАЗЫ

Л.А. Жуковская, Т.В. Семашко, Е.В. Клундук
Институт микробиологии НАН Беларусь, Минск

Аннотация. Определена нуклеотидная последовательность ДНК *Streptococcus* sp., соответствующая гену лактатоксидазы (*lctO*). Выделен ген *lctO*, кодирующий данный фермент. Сконструирован вектор, несущий ген *lctO* *Streptococcus* sp. Получены рекомбинантные штаммы *E. coli* *pET24 b(+) LAC S3* и *E. coli* *pET24 b(+) LAC S4*, продуцирующие лактатоксидазы.

Ключевые слова: лактатоксидаза, генетическая конструкция, рекомбинантные штаммы.

Введение. Ферменты – макромолекулярные биокатализаторы, ускоряющие биохимические реакции с большой эффективностью. Лактатоксидазы – глобулярные флавопротеины, к которым относятся (S)-2-оксикислотная оксидаза, L-лактатоксидаза и лактат-2-монооксигеназа. L-лактатоксидаза (КФ 1.1.3.X) катализирует окисление L-лактата с образованием пирувата и пероксида водорода [1, 2].



Механизм действия L-лактатоксидаз заключается в переносе двух электронов и двух протонов от восстановленного ФМН (флавинмононуклеотида) на молекулярный кислород (по типу пинг-понг) [2, 3].

Лактатоксидазы могут использоваться в медицине для мониторинга уровней L-лактата в биологических образцах для диагностики различных заболеваний, таких как сепсис, гипоксия, травмы, митохондриальные нарушения, лейкемия, опухолевые заболевания, сахарный диабет и гипоксическая ишемическая энцефалопатия новорожденных [3-5]. Концентрация лактата в крови является критерием, позволяющим оценить степень тяжести заболеваний, в интенсивной терапии – маркером метаболических нарушений. Также изменение уровня лактата в крови является более показательным предиктором развития острого респираторного дистресс-синдрома и полиорганной недостаточности у больных с политравмой по сравнению с известной шкалой АРАСНЕ. Данный фермент может быть использован в качестве диагностического инструмента в спортивной медицине для оценки выносливости спортсменов [3]. Кроме того, обнаружение лактата в продуктах питания и напитках может способствовать определению срока их годности и общего качества, что делает лактатоксидазу ценным инструментом в области производства пищевых продуктов. В винодельческой индустрии данный фермент является важным средством контроля процессов брожения вина и обеспечения высокого качества этого продукта [6].

Лактатоксидаза обнаружена у бактерий родов *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*. L-лактатоксидаза бактерий *A. viridans* представляет собой флавопротеин, тетramer с молекулярной массой субъединицы 48 кДа [6]. Фермент проявляет строгую субстратную специфичность к L-лактату, а Константа Михаэлиса ферmenta составляет 5,3 мМ.

L-лактатоксидазная активность обнаружена также у дрожжей *Yarrowia lipolytica*, которые синтезируют фермент в процессе роста на L-лактате в качестве единственного источника углерода и энергии, а также при воздействии стрессоров (оксидантов, повышенной температуры) [2]. Фермент является тетramerом с молекулярной массой, равной 200–230 кДа, и субъединиц – 50–56 кДа.

Не смотря на высокую социальную значимость лактатоксидаз из литературных источников известно о небольшом количестве работ по характеристике, клонированию и секвенированию данного фермента. Известно, что ген лактатоксидазы (*lctO*) *S. iniae* кодирует полипептид, состоящий

из 398 аминокислот с молекулярной массой 44,7 кДа. При сравнении этого гена с генами, находящимися в базах данных GenBank и EMBL выявлено высокое сходство (200 идентичных участков) с L-лактатоксидазой *A. viridans* [7].

Материалы и методы. Источником структурного гена *lctO*, кодирующего аминокислотную последовательность лактатоксидазы, служила хромосомная ДНК выделенного нами ранее штамма *Streptococcus* sp. ДНК выделяли с помощью фенол-хлороформного метода. Ген *lctO* амплифицировали с помощью ПЦР, используя синтетические праймеры и Flash ДНК-полимеразу («АртБиоТех», Беларусь). Для подбора олигонуклеотидов применяли программное обеспечение SnapGene 1.1.3 («GLS Bioech LLC», США). На 5'-окончания праймеров были добавлены последовательности, комплементарные плазмиде pET24 b(+) («Novagen», США). Продукты амплификации детектировали методом электрофореза в агарозном геле.

Для качественного определения лактатоксидазной активности тест-полоски (фильтровальную бумагу с нанесенным индикаторным раствором, содержащим 1 мг пероксидазы (40 ед/мл по пирогаллолу), 40 мкл 85 % молочной кислоты, 8 мг о-дианизидина дигидрохлорида) помещали на изолированные колонии, выросшие на LB среде с добавлением канамицина. Для количественного определения лактатоксидазной активности полученных трансформантов, бактерии выращивали в течение 24 ч глубинным способом в колбах Эрленмейера в жидкой питательной среде LB, содержащей канамицин – 0,01 %. При достижении оптической плотности культуральной жидкости 0,6-1,0 ($\lambda=600$ нм) в среду вносили индуктор – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (CarlRoth, Германия) до конечной концентрации 1 мМ и продолжали культивирование в течение 5 ч при температуре 37°C.

По окончании глубинного культивирования микроорганизмов биомассу отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 8 000 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Фильтраты культуральных жидкостей использовали для количественного определения лактатоксидазной активности. Наличие внутриклеточных лактатоксидаз проверяли после разрушения клеток ультразвуком (300 секунд при частоте 30 кГц и мощности 210 Вт/дм³). Полученный лизат использовали для анализов.

Определение активности лактатоксидазы проводили спектрофотометрически при длине волны 500 нм (A500, толщина кюветы = 1 см). За единицу активности лактатоксидазы принимали такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль молочной кислоты в пировиноградную кислоту за 1 мин [8].

Результаты исследования и их обсуждение. Основываясь на литературных данных, был проведен сравнительный анализ известных последовательностей генов микроорганизмов, кодирующих фермент лактатоксидазу. Определена нуклеотидная последовательность ДНК *Streptococcus* sp., соответствующая гену лактатоксидазы. Выделен ген *lctO*, кодирующий данный фермент. Установлено, что ген *lctO* кодирует полипептид размером 39,7 кДа, не имеет инtronных последовательностей и не содержит редких кодонов, что позволило использовать его в качестве реципиента *Escherichia coli*.

На основе плазмиды pET24 b(+) сконструирован вектор для переноса гена *lctO* в клетки *E. coli* (рисунок 1). Проведена трансформация клеток *E. coli*. Отбор трансформантов, содержащих вектор, осуществляли путем их культивирования на среде LB с канамицином.

Анализ способности полученных трансформантов синтезировать лактатокисляющие ферменты проводили в два этапа: путем высева на агаризованные среды и глубинного культивирования.

На первом этапе были отобраны 40 трансформантов на основании изменения окраски фильтровальной бумаги от светло-желтой до ярко-оранжевой и красно-коричневой. Дальнейший анализ позволил отобрать 2 штамма *E. coli* pET24 b(+) LAC S3 и *E. coli* pET24 b(+) LAC S4, характеризующиеся уровнем продукции лактатоксидазы 0,5-1,0 ед/мл (рисунок 2).

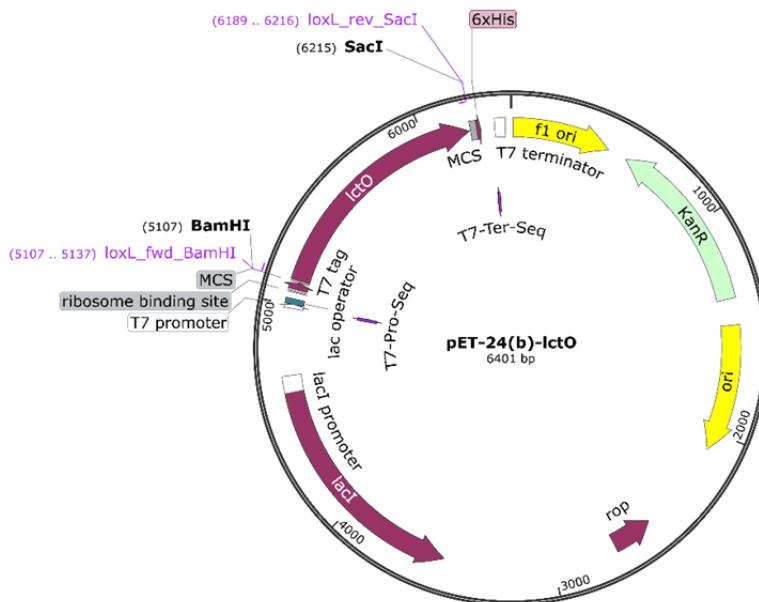


Рисунок 1. – Карта генетической конструкции, несущей ген *lctO Streptococcus* sp.

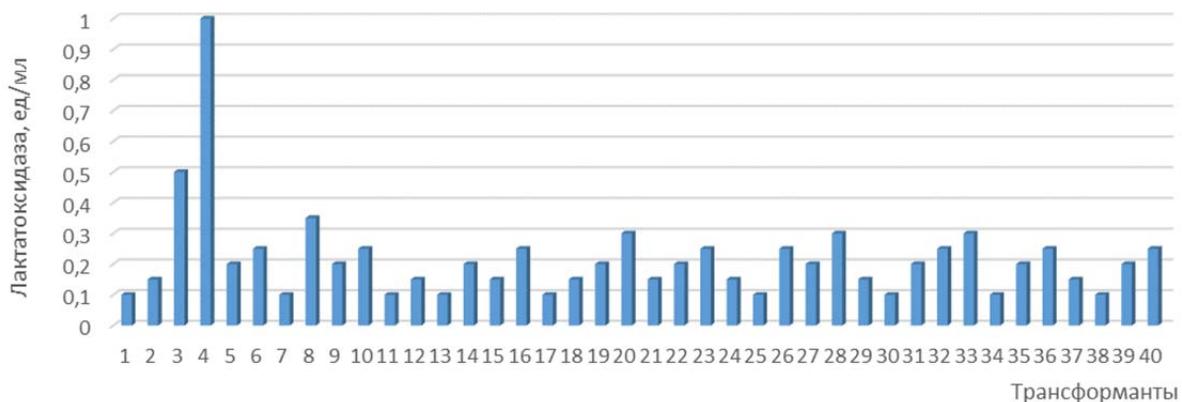


Рисунок 2. – Лактатоксидазная активность трансформантов *E. coli*.

Заключение. Таким образом, сконструирован вектор, несущий ген *lctO Streptococcus* sp. Получены рекомбинантные штаммы *E. coli* pET24 b(+) LAC S3 и *E. coli* pET24 b(+) LAC S4, производящие лактатоксидазы. Данные штаммы будут использованы для дальнейшей работы по оптимизации продукции фермента.

Список использованных источников

1. The 2.1 Å structure of *Aerococcus viridans* L-lactate oxidase (LOX) / I. Leiros [et al.] // Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun. – 2006. – V. 62. – P. 1185–1190.
2. Бирюкова, Е.Н. L-лактатоксидазные системы микроорганизмов / Е.Н. Бирюкова, А.Ю. Аринбасарова, А.Г Меденцев // Микробиология. – 2022. – Т. 91, № 2. – С. 150–159.
3. Gladden, L.B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium / L.B. Gladden // J. Physiol. – 2004. – V. 558. – P. 5–30.
4. Rise in plasma lactate concentrations with psychosocial stress: a possible sign of cerebral energy demand / B. Kubera [et al.] // Obes. Facts. – 2012. – V. 5. – P. 384–392.
5. Rational engineering of *Aerococcus viridans* L-lactate oxidase for the mediator modification to achieve quasi-direct electron transfer type lactate sensor / K. Hiraka [et al.] // Biosens. Bioelectron. – 2019. – V. 151. – P. 111974.
6. Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of L-lactate oxidase (LOX), R181M mutant, from *Aerococcus viridans* / Y. Umena [et al.] // Acta Cryst. – 2005. – V. 61. – P. 439–441.
7. Cloning and Analysis of the L-Lactate Utilization Genes from *Streptococcus iniae* / A. Gibello [et al.] // Applied and environmental microbiology. – 1999. – Vol. 65, № 10. – P. 4346–4350.
8. Determination of Blood Lactate Concentration: Reliability and Validity of a Lactate Oxidase-based Method / R. White [et al.] // International Journal of Exercise Science. – 2009. – Vol. 2, Iss. 2. – P. 83–93.

УДК 579.222+577.152.531+664.0