РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 527 892**(13) **C2**

(51) МПК
C07K 14/195 (2006.01)
B09C 1/10 (2006.01)
C01G 43/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2012116151/10, 21.09.2010**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.09.2010

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
21.09.2009 ZA 2009/06569

(43) Дата публикации заявки: **27.10.2013** Бюл. № 30

(45) Опубликовано: **10.09.2014** Бюл. № **25**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **VAN HEERDEN E. ET AL. Metabolic promiscuity from the deep subsurface: a story of survival of superiority // PROCEEDIING OF THE SPIE, vol. 7097, 2008, pp. 1-12. LOVLEY D.R. ET AL. Microbial reduction of uranium // Letters to Nature, vol. 350, 1991, 413-416. US 2006014261 A1, 19.01.2006. WO 1993013883 A1, 22.07.1993. СЛОБОДКИН А.И. Термофильные** (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **23.04.2012**

(86) Заявка PCT:
IB 2010/054259 (21.09.2010)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2011/033491 (24.03.2011)

Адрес для переписки:
109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО "Союзпатент", Е.В.Воробьевой

(72) Автор(ы):
КАСОН Эррол Дюнкан (ZA),
ВАН ГЕРДЕН Эста (ZA),
ПИАТЕР Лизелле Анн (ZA),
ЮГДАВЕ Абитха Гейанендра (ZA),
ВАН МАРВЕЙК Яквилине (ZA)

(73) Патентообладатель(и):
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТЕ ФРИ СТЕЙТ (ZA)

(54) ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКА, ОТВЕТСТВЕННОГО ЗА ВОССТАНОВЛЕНИЕ УРАНА (VI)

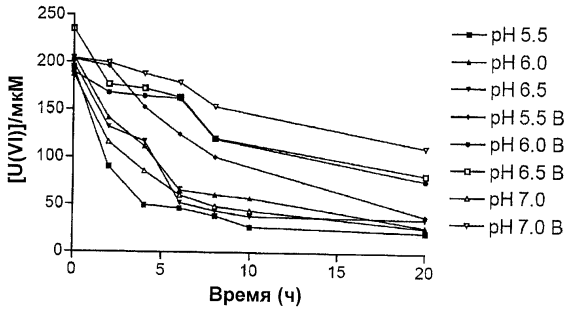
(57) Реферат:

Группа изобретений относится к биотехнологии. Предложен полипептид, полученный из штамма SA-01 Thermus scotoductus, который отвечает за восстановление урана (VI) в источнике урана (VI) до урана (IV), где полипептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1. Предложены также выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид и включающая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:2, вектор экспрессии, включающий указанные молекулы нуклеиновой кислоты, клетка-хозяин, включающий указанный вектор. Предложены также способ получения указанного полипептида и его применение при восстановление урана (VI) в источнике урана (VI) до урана (IV). Группа изобретений обеспечивает высокую степень восстановления урана(VI) до урана (IV). 6 н. и 3

RU 2527892 C2

RU 2527892 C2

з.п. ф-лы, 10 ил.



Фиг. 8

(56) (продолжение):
железовосстанавливающие прокариоты. Автореферат, Москва, 2008, с. 1-48. Найдено в Интернете: www.inmi.ru/upload/export-1_files/khijniak_autoreferat.pdf

RU 2527892 C2

RU 2527892 C2

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 527 892**(13) **C2**

(51) Int. Cl.
C07K 14/195 (2006.01)
B09C 1/10 (2006.01)
C01G 43/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2012116151/10, 21.09.2010**

(24) Effective date for property rights:
21.09.2010

Priority:
(30) Convention priority:
21.09.2009 ZA 2009/06569

(43) Application published: **27.10.2013** Bull. № **30**

(45) Date of publication: **10.09.2014** Bull. № **25**

(85) Commencement of national phase: **23.04.2012**

(86) PCT application:
IB 2010/054259 (21.09.2010)

(87) PCT publication:
WO 2011/033491 (24.03.2011)

Mail address:
109012, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO "Sojuzpatent", E.V.Vorob'evoj

(72) Inventor(s):
KASON Ehrrol Djunkan (ZA),
VAN GERDEN Ehsta (ZA),
PIATER Lizelle Ann (ZA),
JuGDAVE Abitkha Gejanendra (ZA),
VAN MARVEJK Jakviline (ZA)

(73) Proprietor(s):
JuNIVERSITI OF TE FRI STEJT (ZA)

(54) SEPARATION OF PROTEIN, RESPONSIBLE FOR URANIUM (VI)

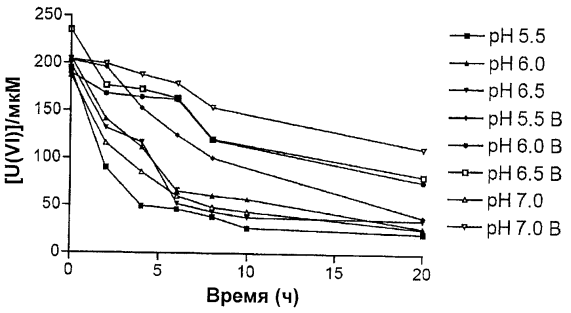
(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: group of inventions relates to biotechnology. Claimed is a polypeptide, obtained from strain SA-01 Thermus scotoductus, responsible for the reduction of uranium (VI) in a uranium (VI) source to uranium (IV), where the polypeptide includes an amino acid sequence SEQ ID NO:1. Also claimed are a separated molecule of nucleic acid, coding the polypeptide and including a nucleotide sequence SEQ ID NO:2, an expression vector, including the said molecules of nucleic acid, a host cell, including the said vector. Also claimed are a method of obtaining the said polypeptide and its application in the reduction of uranium (VI) in the source of uranium (VI) to uranium (IV).

EFFECT: group of inventions provides a high degree of reduction of uranium (VI) to uranium (IV).

9 cl, 10 dwg



Фиг. 8

RU 2527892 C2

RU 2527892 C2

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к выделению и описанию характеристик белка, ответственного за восстановление урана (VI) до урана (IV). Настоящее изобретение распространяется на применение выделенного белка при восстановлении урана (VI) до урана (IV) и дополнительно распространяется на способ биоочистки или, по меньшей мере, на способ частичной очистки области, загрязненной источником U (VI).

Предшествующий уровень техники

В последнее десятилетие наши представления о том, какие условия совместимы с жизнью, претерпели значительные изменения. Ранее антропоцентрический взгляд на природу ограничивал нашу способность оценивать новые микробы и их геномы, но открытие того, что почти все окружающее пространство на земле и даже под землей (на глубине более 4 км) или в областях с отрицательной температурой и с высоким уровнем радиации, вероятно, содержит специально адаптированные к таким условиям формы жизни, сделало данное представление очень важным для понимания микробного биоразнообразия.

Одна из наиболее удивительных черт мира микроорганизмов заключается в том, что, как оказалось, даже наиболее токсичные и явно не поддающиеся воздействию вещества из тех, что разработаны (химической) промышленностью за десятилетия, как правило, являются биодеградируемыми либо одним, либо другим микроорганизмом. В загрязненной среде микроорганизмы могут встречаться с большим разнообразием химических веществ, таких как металлы, поэтому неудивительно, что они будут взаимодействовать с этими металлами (Nies and Sliver, 1995).

Было показано, что выделенные из загрязненной среды устойчивые к U (VI) бактерии обладают способностью успешно удалять токсичный U (VI) из среды либо путем восстановления (как правило, с помощью бактерий), либо путем биосорбции (обычно с помощью грибов) (van Heerden et al., 2008).

В последнее время микробное восстановление металлов привлекает интерес, поскольку эти преобразования могут играть критическую роль в цикле неорганических и органических частиц и, таким образом, открывают новые и удивительные области исследований с потенциальным практическим применением (Anderson et al., 1998; Rooney-Varga et al. 1999; Lovley and Lloyd, 2000; Anderson et al., 2003; Lovley et al., 2004). Было показано, что диссимилятивно восстанавливающие металлы бактерии (англ. Dissimilatory metal reducing bacteria, DMRB) получают энергию для поддержания анаэробного роста путем объединения окисления Hz или органического вещества с восстановлением разнообразных многовалентных металлов. Этот метаболизм может приводить к полной минерализации органического вещества или к осаждению или иммобилизации металлических загрязнителей в анаэробных условиях (Sani et al., 2002).

Для биоочистки загрязненных ураном областей химия элементов предлагает способ, который в течение последних 20 лет привлекает к себе много внимания. Окисленное состояние урана является критическим для его стабильности, подвижности и биодоступности. Уран в окисленном состоянии или шестивалентный уран (VI) является сильнорастворимым и, таким образом, подвижным, в то время как уран в восстановленном состоянии или четырехвалентный уран (IV) является относительно нерастворимым. В отработанном состоянии уран присутствует, главным образом, в виде растворимых солей уранил-иона (UO_2^{2+}). При восстановлении уранил-иона из окисленного состояния U (VI) до менее окисленного состояния, такого как U (IV), растворимость его падает, и он становится иммобилизованным.

Список бактерий, которые, как известно в данной области, восстанавливают U (VI),

постоянно растет. При инкубации Thermus scotoductus SA-01 с U (VI) в анаэробных условиях U (VI) будет осаждаться из раствора, демонстрируя тем самым, что Thermus scotoductus SA-01 обладает способностью восстановления U (VI). Исследования также продемонстрировали, что в анаэробных условиях с использованием лактата в качестве донора электронов Thermus scotoductus SA-01 обладает способностью восстанавливать почти 100% из 0,25 мМ раствора U (VI) за менее чем 30 часов (van Heerden et al., 2008).

При этом очень мало известно о механизмах, вовлеченных в восстановление U (VI), и о белках, вовлеченных в эти механизмы, и, соответственно, неоспоримое доказательство того, какие белки ответственны за восстановление урана, пока отсутствует.

Для целей настоящего описания, под значением термина «полипептид» понимают пептиды и белки, которые включают две или несколько аминокислот, связанных посредством пептидных связей.

Сущность изобретения

Согласно своему первому аспекту, в настоящем изобретении предлагается выделенный полипептид, полученный из штамма SA-01 Thermus scotoductus, который отвечает за восстановление урана (VI) в источнике урана (VI) до урана (IV), где полипептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID No:1.

Выделенный полипептид отличается тем, что он является гомогенным белком, имеющим молекулярную массу 70 кДа, что продемонстрировано электрофорезом ДСН-ПААГ.

В изобретении дополнительно предлагается выделенный полипептид, который является пептид-связывающим белком, ABC-транспортером пептидов, что показано с помощью анализа NCBI BLASTP.

Заявитель считает, что выделенный полипептид, определенный в данном документе, способен осуществлять более чем одну функцию, а именно функцию ABC-транспортера пептидов, пептид-связывающего белка и уран-редуктазы. Такие белки, как правило, обозначают в данной области как «многофункциональные белки» (англ. moonlighting proteins).

Выделенный полипептид, определенный в данном документе, обладает дисульфидной связью, которая при расщеплении восстанавливающим агентом дает сайт нуклеации для восстановления U (VI).

Согласно своему второму аспекту в настоящем изобретении предлагаются выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие аминокислотную последовательность SEQ ID No:1, которые включают нуклеотидную последовательность SEQ ID No:2.

Для упрощения поиска, ниже также изложены аминокислотная и нуклеотидная последовательности, упомянутые в данном описании и содержащиеся в перечне последовательностей, поданных вместе с данным документом. Подчеркиванием обозначены аминокислоты в SEQ ID No: 1, которые представляют собой N-концевую аминокислотную последовательность, которую использовали для идентификации полипептида в качестве пептид-связывающего белка, ABC-транспортера пептидов.

SEQ ID No: 1-

MetArgLvsValGlyLysLeuAlaValPheGlyLeuAlaAlaLeuGlyLeuAlaLeuAlaGlyProGlnAsp
AsnSerLeuValIleGlyAlaSerGlnGluProArgValLeuAlaGlyAspPheLeuSerIleIleSerAsnGlnSerIleL
ysLeuGluIleGluGlnTyrLeuPheAlaProLeuIleGlyPheAsnAlaAsnSerGluAsnPheProValLeuValThr
GluValProThrArgGlnAsnGlyArgLeuArgValThrAspIleGlyGlyGlyLysLysArgLeuGluMetAspLe
uThrIleArgProAspAlaArgTrpSerAspGlyLysProIleThrThrGluAspValAlaPheTyrTyrGluValGlyL
ysAlaLysGlyMetProValLeuAsnProAspTyrTrpGluArgValAsnLeuArgValArgAspAlaArgAsnPhe
ThrValIlePheGluProAlaTyrTyrTyrAspThrTyrGlyGlyThrTyrGlySerProIleGlyTyrAlaProLysHisI
leetGlyAlaGluTrpGluLysValLysAlaAlaAlaArgAsnLeuAspProAspLysAspAlaGluArgLeuAsnGl
uLeuTyrArgAsnPhePheLeuLysPheAlaThrProGlnAlaLeuAsnArgGlyAlaMetValTyrSerGlyAlaPh
eLysLeuArgArgTrpValProGlyAsnSerIleGluMetGluArgAsnProAsnPheProIleLysProGluGlyGly
GluSerArgTyrValGlnArgValValTyrArgPheileGlnAsnThrAsnSerLeuLeuValAlaValLeuGlyGlyS

erIleAspAlaThrSerSerValSerLeuThrPheAspGlnGlyArgSerArgGlnLeuThrSerArgAlaProGlyArg
PheAspIleTrpPheValProGlyAlaIleTrpGluHisIleAspValAsnLysPheGluAsnCysGlnAlaValArgAs
pLeuGlyLeuAsnAspValArgThrArgArgAlaLeuLeuHisAlaLeuAsnArgGluGlyLeuValLysAlaPhe
PheAspGlyLeuGlnProValAlaHisThrTrpIleAlaProVaiAsnProLeuPheAsHProAsnValArgLysTyr
GluPheAspLeuLysLysAlaGluAlaLeuLeuAlaGluMetGlyTrpArgLysGlyProAspGlyileLeuGlnArg
ThrValGlyGlyArgThrValArgPheGluIleGluPheValThrThrAlaGlyAsnAlaIleArgGluArgThrGlnGl
nPhePheAlaGluAspLeuLysLysIleGlyIleAlaValLysIleAsnAsnAlaProSerAlaValValPheAlaAspA
spTyrIleGlnArgAlaSerGluCysLysTThrGlyLeuPheGluPheAlaTrpValSerAsnLeuAlaGluAspGlyS
erLeuPheGlnTyrLysAsnLeuAsnThrGlyAlaIleMetValProThrLysGluAsnAsnTyrGlnGlyGlnAsnIl
eGlyGlyTrpArgAsnAspGluPheAspArgLeuThrSerGlnGlyValLeuGluPheAspGluAlaArgArgLys
GlnLeuPheTrpArgAlaGlnGluIleTrpAlaGluGluLeuProAlaLeuProLeuTyrPheArgAlaAsnProTyrV
alValArgLysGlyLeuValAsnTyrValAlaSerAlaTyrAlaGlyGlyTyrGlyTyrProGlyTrpAsnAlaTrpGl
uIleGlyTrpGluSeTArgGlyAlaValLysLysTrpAspGlnAlaLysTyrAlaLeuSerValLys

SEQ ID No: 2-

ATGAGAAAAGTAGGCAAGCTGGCTGTATTCGGTTTAGCCGCCCTGGGCTTGGC
CCTGGCGGGGCCCCAGGACAACAGCCTGGTCATAGGGGCTTCGCAGGAGCCCCGGG
TTCTGGCGGGGGACTTCCTAAGCATCATCTCCAACCAGTCCATCAAGTTGGAGATCG
AGCAGTACCTCTTCGCCCCCCTCATCGGTTTCAACGCCAACAGCGAAAACTTTCCCG
TGCTGGTCACCGAGGTGCCCACCCGGCAAAACGGGCGTTTGCGGGTGACGGACATC
GGCGGGGGCAAGAAGCGCTTGGAGATGGACCTCACCATCCGGCCCGATGCCCGCTG
GTCCGACGGCAAGCCCATCACCACCGAGGATGTGGCCTTCTACTACGAGGTGGGCA
AGGCCAAGGGGATGCCGGTGCTCAACCCGGACTACTGGGAGCGGGTGAACCTCCGG
GTCAGGGACGCCCGCAACTTCACCGTGATCTTTGAGCCCGCCTACTACTACGACACC
TACGGCGGCACCTACGGCTCCCCCATCGGCTACGCTCCCAAGCACATCATGGGCGCC
GAGTGGGAGAAGGTGAAAGCGGCGGCCCGGAACCTGGATCCCGATAAGGATGCGG
AGAGGCTCAACGAGCTCTACCGCAACTTCTTCCTCAAGTTCGCCACTCCCCAGGCCC
TAAACCGGGGAGCCATGGTCTACTCGGGGGCCTTCAAGCTGCGGCGCTGGGTGCCG
GGGAACTCCATTGAGATGGAGCGGAACCCCAACTTCCCCATCAAGCCCGAGGGTGG
GGAGAGCCGGTACGTGCAGAGGGTGGTCTACCGCTTCATCCAGAACACCAACTCCC
TCCTGGTGGCCGTCCTGGGCGGGAGCATTGACGCCACCTCCAGCGTCTCCCTCACCT
TTGACCAAGGCCGTAGCCGCCAGCTCACCTCCCGGGCCCCTGGCCGCTTTGACATCT
GGTTCGTGCCCGGGGCCATCTGGGAGCACATTGACGTCAACAAGTTTGAGAACTGC
CAGGCGGTCCGCGACTTGGGCCTGAACGACGTCCGCACCCGTCGGGCCCTCCTCCAC
GCTCTGAACCGCGAGGGGTTGGTCAAGGCCTTCTTTGACGGCCTCCAGCCCGTGGCC

CACACCTGGATCGCCCCCGTCAACCCCCTCTTCAACCCCAATGTGCGGAAGTACGAG
TTTGACCTGAAGAAGGCGGAGGCGCTCTTGGCGGAGATGGGCTGGAGGAAGGGGCC
GGACGGCATCCTTCAGCGCACCGTGGGTGGCCGCACCGTGCGCTTTGAGATTGAGTT
CGTCACCACCGCGGGCAACGCTATCCGGGAGCGCACCCAGCAGTTCTTCGCCGAGG
ACCTGAAGAAGATCGGCATCGCCGTCAAGATCAATAACGCCCCCAGCGCCGTGGTC
TTCGCCGACGACTACATCCAGCGGGCCAGCGAGTGCAAGTGGACCGGGCTGTTTGA
GTTCGCTTGGGTTTCCAACCTGGCCGAGGATGGCTCCCTCTTCCAGTACAAGAACCT
GAACACCGGGGCCATCATGGTGCCCACCAAGGAGAACAACTACCAGGGGCAGAAC
ATCGGCGGCTGGCGCAACGACGAGTTTGACCGTCTGACGAGCCAGGGTGTCCTGGA
GTTTGACGAGGCCAGGCGGAAGCAGCTCTTCTGGAGGGCCCAGGAGATCTGGGCCG
AGGAGCTGCCTGCCTTGCCCCTCTACTTCCGCGCTAACCCCTACGTGGTGCGGAAGG
GCCTGGTCAACTACGTGGCCAGCGCTTACGCGGGCGGCTACGGTTACCCCGGCTGG
AACGCTTGGGAGATCGGCTGGGAGAGCCGCGGCGCCGTGAAGAAGTGGGACCAGG
CGAAGTACGCTCTTTCCGTCAAGTAA

В любом из воплощений изобретения, полипептид, идентифицированный в данном документе, выделен из культуры штамма SA-01 Thermus scotoductus, восстановлен и очищен. Типичные процедуры, подходящие для такого восстановления и очистки, включают методы колоночной хроматографии и методы эксклюзионной хроматографии, известные и описанные в данной области. В любом из воплощений настоящего изобретения предлагается очистка белка, которую осуществляют с помощью никелевой аффинной хроматографии с последующей гель-фильтрацией. В альтернативном воплощении, в настоящем изобретении предлагается очистка белка с помощью тепловой денатурации с последующей гель-фильтрацией.

В альтернативном воплощении, полипептид SEQ ID No:1 получают рекомбинантно путем экспрессии нуклеотидной последовательности SEQ ID No:2, кодирующей полипептид в клетке-хозяине. С помощью экспрессирующего вектора молекулы нуклеиновых кислот, содержащие нуклеотидные последовательности SEQ ID No:2, можно трансфецировать и экспрессировать в клетке-хозяине.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к векторам, вводящим нуклеотидную последовательность SEQ ID No:2 в клетки-хозяева, которые генетически сконструированы с использованием одного или нескольких рекомбинантных экспрессирующих векторов, и к получению полипептида SEQ ID No:1, идентифицированного в данном документе с помощью рекомбинантных методов, хорошо известных в данной области.

В настоящем изобретении дополнительно предлагается способ получения, по меньшей мере, одного полипептида, определенного в данном документе, который отвечает за восстановление урана (VI) в источнике урана (VI) до урана (IV), причем способ включает стадии:

a) трансфекции молекул нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:2 в клетку-хозяин;

b) культивирования клетки-хозяина для экспрессии полипептида SEQ ID NO:1 в клетке-хозяине; и

c) необязательно, выделения и очистки полипептида SEQ ID NO:1.

Также согласно изобретению предлагается микроорганизм, трансформированный геном, устойчивым к U (VI), полученным из описанной выше клетки-хозяина, или трансформированный любой его функциональной частью, устойчивой к U (VI).

Для целей настоящего изобретения уран-редуктазную активность определяют путем измерения снижения уровня шестивалентного урана. Уран-редуктазную активность измеряют спектрофотометрически с помощью 2-(5-бром-2-пиридилазо)-5-диэтиламинофенола.

Согласно третьему аспекту, в настоящем изобретении предлагается способ биоочистки или, по меньшей мере, частичной биоочистки области, загрязненной источником U (VI), причем способ включает стадии введения донора электронов в загрязненную область с целью стимуляции пролиферации штамма SA-01 Thermus scotoductus для восстановления U (VI) в источнике U (VI) до U (IV), или способ включает стадию удаления компонентов окружающей среды из области, загрязненной U (VI), и введения донора электронов в эти компоненты в течение достаточного периода времени для того, чтобы у штамма SA-01 Thermus scotoductus была возможность восстановления U (VI) в источнике U (VI), присутствующем там, до U (IV).

В любом из воплощений настоящего изобретения, штамм SA-01 Thermus scotoductus получают из месторождения Мпоненг (Mponeng), расположенного в северо-западной области Витватерсрандского бассейна в северо-западной провинции Южной Африки, которое разрабатывает компания «Western Deep Levels, Inc.», или из компонентов окружающей среды, полученной из этой области.

Для целей описания настоящего изобретения, термин «компоненты окружающей среды» обозначает твердые или жидкие стоки, грунт, осадочные отложения, водную массу или комбинацию одного или нескольких из этих компонентов.

В любом из воплощений настоящего изобретения, источник U (VI) выбран из группы, состоящей из $UO_2(CH_3COO)_2.2H_2O$ и $UO_2(NO_3)_2$. Понятно, что источник урана по настоящему изобретению не ограничивается вышеупомянутым и, соответственно, может представлять собой любой подходящий источник шестивалентного урана.

В любом из воплощений настоящего изобретения, восстановление имеет место в аэробных и/или анаэробных условиях. Предпочтительно, если восстановление имеет место при анаэробных условиях, чтобы предотвратить окисление восстановленного U (IV) до U (VI).

Как упомянуто в данном документе ранее, восстановление U (VI) до U (IV) инициируется с помощью донора электронов. Понятно, что донором электронов может быть любой подходящий донор электронов, известный и описанный в данной области. В любом из воплощений изобретения, донор электронов выбран из группы, состоящей из H_2, восстановленного хинона (конкретно, гидрохинона), ацетата, лактата, лимонной кислоты и пирувата.

Вышеупомянутый способ может применяться для биоочистки или, по меньшей мере, для частичной биоочистки области, загрязненной источником шестивалентного U, причем практически биоочистка может быть осуществлена in situ, ex situ или и in situ, и ex situ.

Согласно четвертому аспекту, в настоящем изобретении предлагается применение выделенного полипептида SEQ ID No:1, определенного и охарактеризованного в данном документе, при восстановлении урана (VI) в источнике урана (VI) до урана (IV).

Кроме того, в настоящем изобретении предлагается применение штамма SA-01 Thermus scotoductus в биоочистке или, по меньшей мере, в частичной биоочистке области, загрязненной U (VI), или компонентов окружающей среды, загрязненных U (VI).

В изобретении дополнительно предлагается применение штамма SA-01 Thermus scotoductus в биоочистке или, по меньшей мере, в частичной биоочистке области, загрязненной U (VI), или компонентов окружающей среды, загрязненных U (VI), где указанный штамм SA-01 Thermus scotoductus получают из области, загрязненной U (VI), или из компонентов окружающей среды, загрязненных U (VI), которые следует подвергнуть очистке или, по меньшей мере, частичной очистке.

Также согласно изобретению, предлагается применение микроорганизма, трансформированного геном, устойчивым к U (VI), полученным из клетки-хозяина, описанной выше, или трансформированный любой его функциональной частью, устойчивой к U (VI), в биоочистке или, по меньшей мере, в частичной биоочистке области, загрязненной (VI), или компонентов окружающей среды, загрязненных U (VI).

Эти и другие цели, признаки и преимущества изобретения станут очевидными для специалиста в данной области благодаря следующему подробному описанию изобретения.

Краткое описание чертежей

Фигура 1: график, изображающий кривые роста Thermus scotoductus при различных концентрациях урана. Среда TYG (■), дополненная 0,25 мМ (A), 0,5 мМ (T), 0,75 мМ (♦), 1 мМ (•), 1,25 мМ (□) и 1,5 мМ (A) U(VI) в ходе инокуляции (t=0);

Фигура 2: график, изображающий стандартную кривую зависимости оптической плотности разведенного определенным образом образца урана от разведенного определенным образом образца урана с известной концентрацией;

Фигура 3: график, демонстрирующий восстановление урана (VI) с помощью T. scotoductus SA-01 при отсутствии условий для роста. Клетки, собранные в поздней экспоненциальной фазе с использованием аналитического раствора, содержащего 0,25 мМ U(VI) и 10 мМ лактат в качестве донора электронов (■), контрольный аналитический раствор клеток, собранных в поздней экспоненциальной фазе, содержащий 0,25 мМ U (VI) и не содержащий доноров электронов (▲), клетки, собранные в ранней экспоненциальной фазе с использованием аналитического раствора, содержащего 0,25 мМ U(VI) и 10 мМ лактат в качестве донора электронов (▼), контрольный аналитический раствор клеток, собранных в ранней экспоненциальной фазе, содержащий 0,25 мМ U(VI) и не содержащий доноров электронов (♦), клетки, собранные в поздней экспоненциальной фазе с использованием раствора, содержащего 0,25 мМ U(VI) и 10% водород в качестве донора электронов (•), контрольный аналитический раствор, содержащий автоклавированные клетки и не содержащий доноров электронов (□), контрольный аналитический раствор без клеток, содержащий в качестве доноров электронов 10 мМ лактат (Δ) и 10% водород (V);

Фигура 4: график, изображающий активность восстановления урана (VI) комбинации мембранной и периплазматической фракций из T. scotoductus SA-01 после диализа и с продувкой газом 10% H_2 и с гидрохиноном в качестве доноров электронов;

Фигура 5: график, изображающий профиль десорбции для «Super-Q Toyopear», относительно активности восстановления урана (VI);

Фигура 6: график, изображающий профиль десорбции для «SP Toyopear», относительно активности восстановления урана (VI);

Фигура 7: ДСН-ПААГ гель-анализ, демонстрирующий выделенный белок уран-редуктазы;

Фигура 8: график, демонстрирующий восстановление урана (VI) при различных значениях pH. Значения pH: (■) 5,5, (▲) 6, (▼) 6,5, (Δ) pH 7, (♦) 5,5, контроль без белка, (•) pH 6, контроль без белка, (□) pH 6,5, контроль без белка, (V) pH 7, контроль без

белка;

Фигура 9: график, демонстрирующий восстановление урана (VI) при различных значениях pH. Значения pH: (▲) 7,5, (■) 8, (▼) 8,5, (♦) 9, (□) pH 7,5, контроль без белка, (•) pH 8 контроль без белка, (Δ) pH 8,5 контроль без белка, (V) pH 9 контроль без белка; и

Фигура 10: график, демонстрирующий восстановление урана (VI) при 55°C (■) и 65°C (▲) с вычитанием холостой пробы.

Раскрытый настоящим объект изобретения далее будет описан более полно со ссылкой на прилагаемые Примеры, в которых представлены характерные воплощения. Однако раскрытый настоящим объект изобретения может быть воплощен в различных формах и его не следует толковать как ограниченный воплощениями, представленными в данном документе. Скорее, эти воплощения предлагаются для того, чтобы данное раскрытие было детальным и полным и полностью передавало бы смысл воплощений специалистам в данной области.

Примеры

Изобретение осуществляли согласно следующим стадиям.

Выращивание Thermus scotoductus SA-01

Термофильные бактерии Thermus scotoductus штамма SA-01, применяемые в данном документе, были выделены в 1999 Kieft et al. из образцов подземных вод, собранных на глубине приблизительно 3,2 км в золотопромышленном руднике «Мпоненг», который располагается в северо-западной области Витватерсрандского бассейна в северо-западной провинции Южной Африки и который разрабатывает компания «Western Deep Levels, Inc.».

Thermus scotoductus SA-01, депонированный в Американской коллекции типовых клеточных культур под учетным номером ATCC No. 700910, высевали из глицеринового стока на твердую среду TYG и выращивали в течение 24 часов при 65°C. Затем клетки пересевали снова на твердую среду TYG и выращивали в течение 24 часов при 65°C. Материал для посева получали путем инокуляции микробиологической петли со средой из чашки в 50 мл жидкой среды TYG. Этот материал выращивали в течение 8 часов при 65°C, после чего 10 мл выращенного материала переносили в 90 мл жидкой среды TYG. Этот материал затем выращивали в течение 8 часов при 65°C, после чего 5 мл выращенного материала переносили в 95 мл жидкой среды TYG.

Предварительно было определено, что 8 часов - это период времени, необходимый для роста организма до поздней экспоненциальной фазы.

Как видно из Фигуры 1, Thermus scotoductus SA-01 обладает способностью расти при концентрациях урана до 1,25 мМ. Однако также из Фигуры можно отметить, что повышение концентрации урана выше 1,25 мМ приводит к снижению способности эффективного роста у Thermus scotoductus SA-01.

Спектрофотометрическое определение U (VI)

Все реактивы относились к категории аналитических реагентов. Деионизованную воду использовали для приготовления стандартных растворов. Получали 100 мМ раствор $UO_2(CH_3COO)_2.2H_2O$ в воде. Полученный раствор хранили в темноте и использовали для последовательного разведения. 5-Br-PADAP растворяли в этаноле для получения 0,05% раствора. Раствор комплексообразующих лигандов (pH 7,8) получали путем растворения 1 г NaF и 13 г сульфосалициловой кислоты в 40 мл воды, затем регулировали pH с помощью NaOH и раствор разводили до 100 мл. Буферный раствор (pH 7,8) получали путем разведения 14 г TEA в 80 мл воды, затем регулировали pH с помощью перхлорной кислоты и раствор оставляли на ночь. Перед использованием

pH буферного раствора регулировали до 7,8 с помощью перхлорной кислоты и раствор разводили до 100 мл. Все измерения оптической плотности проводили на приборе «Spectronic® Genesys™ 5» при длине волны 600 нм (Johnson and Florence, 1971).

Разведения U (VI) проводили путем разведения стокового раствора водой. Отбирали 100 мкл из разведенного раствора U (VI) в 1,5 мл пробирку «Eppendorf», содержащую 25 мкл комплексного раствора. К вышеуказанному добавляли 100 мкл буферного раствора и 80 мкл раствора Br-PADAP и доводили объем с помощью 620 мкл этанола и 75 мкл воды. Данному окрашенному раствору давали постоять в течение около 2 ч и поглощение измеряли при 578 нм относительно холостой пробы (Johnson and Florence, 1971).

Стандартную кривую строили, как изображено на Фигуре 2, путем нанесения данных оптической плотности разведенного определенным образом образца урана относительно известной концентрации U (VI) в разведенном определенным образом образце.

Восстановление U (VI) с помощью Thermus scotoductus SA-01 при отсутствии условий для роста

Клетки T. scotoductus SA-01 собирали из посевного материала со стандартизованным ростом. Клетки промывали три раза 20 мМ буфером Tris-HCl, pH 7, и продували клеточную суспензию N_2 без O_2. В начале анализа, образец культуры добавляли в пробирку, содержащую аналитический раствор (уранилацетат в буфере Tris-HCl, pH 7, вместе с лактатом Na в качестве донора электронов), до конечной концентрации 0,25 мМ U (VI) и 10 мМ донора электронов и подвергали анализу, описанному ниже. Все это осуществлялось в анаэробной камере для предотвращения окисления восстановленного U (IV) до U (VI). Наряду с бесклеточным контролем, также готовили контроль, свободный от доноров электронов.

Активность уран-редуктазы определяли путем измерения снижения уровня шестивалентного урана. U (VI) анализировали спектрофотометрически с использованием 2-(5-бром-2-пиридилазо)-5-диэтиламинофенола (Johnson and Florence, 1971).

При инкубации Thermus SA-01 в анаэробных условиях вместе с U (VI), в растворе происходит осаждение U (IV), что выявляется по получаемому черному осадку (Haas and Northop, 2004), который образуется в клеточном дебрисе. Большая часть урана (VI) превращалась в U (IV) в течение периода времени до 20 часов, что можно наблюдать на Фигуре 3, что соответствует данным, описанным ранее в литературе (Kieft et al., 1999).

Наблюдали, что даже без донора электронов у клеток оставалась способность восстанавливать шестивалентный уран. Не наблюдали никакого химического восстановления в бесклеточном контроле, что говорит о том, что восстановление происходит благодаря клеточной активности.

После завершения эксперимента использованные клетки подвергали действию кислорода в течение ночи, что приводило к исчезновению черного осадка. Определение урана (VI) также проводили после экспонирования на воздухе, и было обнаружено, что большая часть U (IV) в образце окислилась до U (VI). Это говорит о том, что восстановление U (VI) до U (IV), происходящее в случае образования комплексов урана, например комплексов U (VI) фосфатного типа, путем биоосаждения или биоаккумуляции, при этом не приводит к повторному появлению U (VI) в аэробных условиях.

Восстановление урана (VI) с помощью различных доноров электронов

Для определения наиболее эффективного донора электронов при восстановлении урана (VI) в цельных клетках осуществляли анализы восстановления с различными донорами электронов, которые были определены как наиболее подходящие. Для этого

использовали H_2, восстановленный хинон (особенно, гидрохинон), ацетат, лактат, лимонную кислоту и пируват. Наблюдали, что в то время как каждый из доноров электронов способен продуцировать определенное количество восстанавливающих эквивалентов (некоторые доноры электронов в большей степени, чем другие), восстановление урана (VI) непосредственно не связано с получающимися восстанавливающими эквивалентами. Соответственно, можно сделать вывод, что конкретные доноры электронов не обладают каким-либо значимым эффектом при восстановлении урана (VI).

Восстановление урана (VI) при различных значениях pH и температуры

Восстановление урана (VI) в цельных клетках в отсутствие условий для роста осуществляли в интервале pH 5-9. Оказалось, что для активности восстановления урана (VI) с использованием цельных клеток предпочтительны более нейтральные значения pH, при этом максимальная активность наблюдалась при pH от 7 до 8. Очень низкая скорость реакции наблюдалась при значениях pH ниже 7. Поскольку оценивали все соответствующие контроли, то низкая скорость реакции могла быть результатом нефункциональности анализа в данной области значений pH.

Было определено, что оптимальная температура для восстановления урана (VI) с использованием цельных клеток находится в интервале 35-75°C. Отмечается, что температура не оказывает значительное влияние на восстановление в цельных клетках.

Получение субклеточных фракций

Субклеточные фракции получали, как описано у Kaufmann and Lovley (2001). Клетки T. scotoductus SA-01 собирали из посевного материала со стандартизованным ростом через 8 часов роста и промывали три раза 50 мМ буфером Tris-HCl, pH 7,8. Клетки затем ресуспендировали в 50 мМ буфере Tris-HCl, pH 7,8, содержащем 25% (мас./об.) сахарозы. Для осуществления лизиса клеточной стенки к клеточной суспензии добавляли лизоцим (20 мг) (приблизительно 1 г массы во влажном состоянии) и перемешивали в течение 20 мин при 37°C. Na_2-EDTA добавляли до конечной концентрации 5 мМ и перемешивали в течение еще 15 мин при 37°C. В конце добавляли $MgCl_2$ до конечной концентрации 13 мМ и перемешивали суспензию в течение 15 мин при 37°C. Отделение сферопластов от периплазматических фракций осуществляли центрифугированием (20000xg, 30 мин). Сферопласты ресуспендировали в 50 мМ буфере Tris-HCl, pH 7,8.

Для получения мембранной и цитоплазматической фракции использовали протокол, описанный в Gaspard et al., (1998). Добавляли ДНКазу и РНКазу, соответственно, до конечных концентраций 5 пг/мл и 10 пг/мл, а также ингибиторы протеаз и разрушали клетки обработкой ультразвуком (3 раза, 75 Вт, 5 мин) с помощью ультразвукового дезинтегратора (Branson Sonic Power Cell Disrupter B-30) на ледяной бане. Затем суспензию центрифугировали (4000xg, 10 мин) при 4°C для удаления клеточного дебриса. Для отделения мембранной фракции от цитоплазматической фракции надосадочную жидкость центрифугировали (100000xg, 90 мин). Осадок ресуспедировали в 50 мМ буфере Tris-HCl, pH 7,8.

Мембрану, периплазматическую и цитоплазматическую фракцию диализовали против 20 мМ буфера MOPS, pH 7, с помощью прибора «Snakeskin®Pleated Dialysis Tubing» (10000 MWCO) при 4°C заменой буфера 3×2 л.

Определение активности восстановления U (VI) в субклеточных фракциях

CH_2 и восстановленными хинонами в качестве доноров электронов

Периплазматическую и мембранную фракции подвергали эксперименту с восстановлением урана (VI), как описано выше, за исключением того, что фракции

продували смешанным газом $N_2/H_2/CO_2$ (90%/10%/10%) без O_2 и с добавлением 2 мМ гидрохинона для введения 10% H_2 и восстановленных хинонов в качестве доноров электронов. Вначале к образцу фракции добавляли уранил ацетат до конечной концентрации 0,25 мМ U (VI) и проводили анализ. Все манипуляции осуществляли в анаэробной камере для предотвращения окисления восстановленного U (IV) до U (VI).

Комбинацию периплазматической и мембранной фракций скринировали для определения активности восстановления U (VI), так как эта комбинация продемонстрировала многообещающие результаты в отношении наличия уран-редуктазы. Гидрохинон и H_2 применяли в качестве доноров электронов, поскольку на основании литературных данных они были предпочтительными донорами электронов для данного типа белка.

Затем строили график, представленный на Фигуре 4, на которой изображена активность восстановления урана (VI) комбинацией мембранной и периплазматической фракций из T. scotoductus SA-01 после диализа и с продувкой с помощью газа 10% H_2 и с гидрохиноном в качестве доноров электронов.

Как можно видеть на Фигуре 4, комбинация H_2 и восстановленных гидрохинонов дает лучшую активность восстановления. Кроме того, образуется черновато-желтый осадок. Так как было показано, что белки в периплазме осаждают желтый преципитат U (VI), то было неудивительно, что образованный осадок не был полностью черным.

Оптимизация способа выделения представляющего интерес белка с помощью хроматографических методов

Экстракция ионно связанных мембранных белков

Мембранный осадок ресупендировали в 20 мМ буфере MOPS, pH 7, при перемешивании в течение ночи при 5°C. Объем мембранной фракции удваивали с помощью 1 М KCl в 20 мМ буфере MOPS pH 7. Затем раствор перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре, для экстракции периферических мембранных белков и для осаждения мембраны полученную в результате суспензию подвергали ультрацентрифугированию при 100000xg в течение 90 мин при 4°C. Экстрагируемую с помощью KCl мембранную фракцию (надосадочная жидкость в стадии центрифугирования) диализовали против 20 мМ буфера MOPS pH 7 при 5°C с трехкратной заменой буфера по 2 л.

Выделение мембранных/периплазматических фракций

Диализованную экстрагированную с помощью KCl мембранную фракцию в комбинации с периплазматической фракцией применяли на колонке «Super-Q Toyopearl» (8 см×2,8 см), ранее уравновешенной с помощью 20 мМ буфера MOPS, pH 7. Колонки промывали 20 мМ буфером MOPS, pH 7, до тех пор, пока значение $A_{280\ нм}$ не составило менее чем 0,01. Для элюции белков использовали градиент соли 0-1 М NaCl со скоростью потока 5 мл/мин.

Фракции, определенные как активные по восстановлению урана (VI), собирали и диализовали против 20 мМ буфера MOPS, pH 7, с помощью прибора «Snakeskin®Pleated Dialysis Tubing» (10000 MWCO) при 4°C.

Затем строили график профиля элюции для «Super-Q Toyopearl», показанный на Фигуре 5. Обведенные пики на данной Фигуре демонстрируют полученную активность восстановления урана (VI). Фракции, соответствующие обведенным пикам, собирали и наносили на «SP Toyopearl» после диализа.

Диализованный материал применяли на колонках «SP Toyopearl» (8 см×2,8 см), ранее уравновешенных с помощью 20 мМ буфера MOPS, pH 7. Колонки промывали 20 мМ

буфером MOPS, pH 7, до тех пор, пока данные для $A_{280\ нм}$ не составят менее чем 0,01. Для элюции белков использовали градиент соли 0-1 M NaCl со скоростью потока 5 мл/мин. Отобранные фракции собирали (10 мл) и тестировали на предмет активности восстановления урана (VI).

Затем строили график профиля элюции для «Super-Q Toyopearl», представленный на Фигуре 6. Стрелка A указывает на фракцию 11, стрелка B указывает на фракцию 16, стрелка C указывает на фракцию 19, и стрелка D указывает на фракцию 33. На этой Фигуре видно, что во фракциях 16, 19 и 33 показана активность восстановления урана (VI).

Проводили гель-анализ ДСН-ПААГ отобранных фракций после хроматографического разделения на смоле «SP Toyopearl». На Фигуре 7 видно, что дорожка M является маркером молекулярной массы белка; дорожка 1 является фракцией 11; дорожка 2 является фракцией 16; дорожка 3 является фракцией 19; в то время как дорожка 4 является фракцией 33. Соответственно, в результате гель-анализ ДСН-ПААГ показал, что белок, присутствующий во всех трех этих фракциях, представляет собой белок с массой ±70 кДа.

Определение последовательности неизвестного белка

N-концевое секвенирование

Фракцию наносили на 10% ДСН-ПААГ-гель и прогоняли при 100 В. После завершения прогона белки из геля иммобилизовали на PVDF-мембране согласно инструкции производителя. Мембрану с иммобилизованными белками затем окрашивали Кумасси-синим и представляющие интерес полосы вырезали и отправляли на секвенирование.

Полученные результаты показали, что N-концевой последовательностью является XPXDNSLVIG.

Анализ «BLASTP» в базе данных NCBI по последовательности «DNSLVIG» выявил 100% идентичность со следующими белками:

(i) дипептид-связывающий белок из Thermus thermophilus HB27;

(ii) семейство внеклеточных переносчиков растворенных веществ 5 (белок транспорта дипептидов ABC-типа) из T. aquaticus Y51 MC23; и

(iii) олигопептид-связывающий белок из T. thermophilus Hhb8.

Последовательности всех этих белков были идентичны.

Последовательности белков, полученных после анализа «NCBI BLASTP», сравнивали с суммарным геномом Thermus scotoductus SA-01 и выявили 100% идентичность с пептид-связывающим белком, ABC-транспортером пептидов. Также анализ «BLASTP» N-концевой последовательности относительно суммарной последовательностью генома Thermus scotoductus SA-01 выявил 100% идентичность с пептид-связывающим белком, ABC-транспортером пептидов.

Таким образом, последовательность XPXDNSLVIG представляет собой первые остатки последовательности зрелого белка. После анализа «BLASTP» на основании данных хроматограммы N-концевого секвенирования предположили, что первая аминокислота соответствует G, а третий остаток соответствует Q.

Исходя из вышеизложенного, предположили, что N-концевой последовательностью является GPQDNSLVIG.

На основании вышесказанного пришли к выводу, что белок, вовлеченный в восстановление урана, является пептид-связывающим белком, ABC-транспортером пептидов. Также можно заключить, что указанный белок также выполняет функцию уран-редуктазы.

МС/МС-секвенирование

Фракцию 19 наносили на 10% ДСН-ПААГ-гель и прогоняли при 100 В. После завершения прогона полоску геля, соответствующую белку массой ±70 кДа, вырезали и лиофилизировали. Лиофилизированный образец затем отправляли в Центр протеомных и геномных Исследований в Кейптауне для МС/МС-анализа. Всего было получено девять гидролизованных трипсином фрагментов, которые анализировали с использованием пакета программ «Mascot Distiller».

Четыре спектра затем можно было связать с пептид-связывающим белком, ABC-транспортером пептидов.

Таким образом, вышеизложенное служит в качестве подтверждения того, что рассматриваемый белок является пептид-связывающим белком, ABC-транспортером пептидов.

Экспрессия белка и его очистка

Векторы pET28, содержащие последовательность пептид-связывающего белка, ABC-транспортера пептидов, конструировали в соответствии с известными в данной области способами. pET28 содержит последовательность для присоединения к N-концу белка гистидин-богатого участка, что, таким образом, позволяет очищать белок на никелевой аффинной колонке.

ABC/pET28 затем трансформировали в компетентные клетки Rosetta-Gami 2(DE3) pLysS и инокулировали в среду LB, содержащую антибиотик KAN для pET28. Клетки культивировали, выращивали до OD 0,8-1 и индуцировали экспрессию белка путем добавления 1 мМ (конечная концентрация) ИПТГ.

Через четыре часа после начала индукции клетки собирали и промывали. Клетки разрушали во французском прессе для клеток и собирали ультрацентрифугированием (100000xg, 4°C, 90') цитоплазматическую фракцию. Полученный в результате белок из pET28 очищали на никелевой аффинной колонке с последующей стадией гель-фильтрации.

Описание характеристик рекомбинантных ABC-белков

Рекомбинантные белки оценивали на предмет их способности восстанавливать уран (VI). Описание характеристик рекомбинантного белка проводили при таких же физико-химических параметрах, какие использовались при описании характеристик целых клеток.

Для демонстрации того, что дисульфидная связь, присутствующая в белке, обеспечивает сайт нуклеации для восстановления U (VI), необходимо применить восстанавливающий агент для восстановления тиольного компонента. Из возможных восстанавливающих агентов, которые оценивали относительно урана (VI), среди которых дитиотреитол, дитионит натрия и β-меркаптоэтанол, β-меркаптоэтанол давал наименьший уровень химического восстановления урана (VI).

Избыток β-меркаптоэтанола применяли для восстановления дисульфидной связи, присутствующей в белке до проведения эксперимента.

Получение мутантов по цистеину пептид-связывающего белка, ABC-транспортера пептидов

Модель гомологии пептид-связывающего белка, ABC-транспортера пептидов из T, scotoductus SA-01 составляли с помощью программы «Yasara Structure & Whatif». Используемой матрицей являлся олигопептид-связывающий белок из T. thermophilus HB8 (2D5W-B), который имеет 90% идентичность (95% гомологии) с пептид-связывающим белком, ABC-транспортером пептидов из T. scotoductus SA-01.

При моделировании белка на внешней части структуры белка обнаружили

дисульфидную связь, которая после восстановления связи при добавлении восстанавливающего агента, такого как β-меркаптоэтанол, обеспечивает сайт нуклеации для восстановления U (VI).

Остатки цистеина, ответственные за эту связь, располагаются в положениях 337 и 481. Таким образом, для исследования роли остатков цистеина в восстановлении U (VI) каждый из остатков цистеина мутировали на аланин с помощью сайт-направленного мутагенеза. Получали также комбинацию мутантов по обоим цистеинам.

Мутантные белки затем очищали Ni-NTA аффинной хроматографией до степени чистоты 98%, что было показано на гелях, окрашенных Кумасси-синим.

Было показано, что другие белки с цистеиновыми тиол-дисульфидными мостиками, такие как тиоредоксин из Desulfovibrio desulfwicans, штамма G20 (Li and Kmmholtz, 2009), также обладают способностью восстанавливать U (VI).

Восстановление U (VI) цистеиновыми мутантами осуществляли в реакциях с 320 пг/мл белка при pH 7 и 65°C.

Участие цистеиновых остатков в ферментативной активности

Оба мутанта, Cys-337 и Cys-481, продемонстрировали очень слабую активность или ее отсутствие по сравнению с диким типом. Двойные мутанты продемонстрировали отсутствие значимой активности. Результаты этих анализов ясно говорят о том, что Cys-337 и Cys-481 необходимы для восстановления U (VI).

Влияние pH на восстановление урана (VI)

По существу, восстановление, осуществляемое с помощью восстановленной ди сульфидной связи, можно наблюдать по восстановлению с сероводородом. Hua и соавторы (2006) наблюдали, что восстановление урана (VI) с помощью сероводорода оптимально протекало при нейтральных значениях pH, и лучше всего его можно представить следующим уравнением:

$$UO_2^{2+} + HS' = UO_2 + S^0 + H^+$$ (Hua et al., 2006)

Наибольшую степень восстановления можно было наблюдать при значениях pH от 7 до 8 (Фигуры 8 и 9), что согласуется с тем, что наблюдалось ранее и описано в литературных данных для восстановления сульфида (Hua et al., 2006). При значениях pH ниже 7 и выше 8 степень химического восстановления урана (VI) с помощью β-меркаптоэтанола в образцах, лишенных белка, была очень высокой. Такое восстановление может происходить из-за pH-ингибирования восстановления дисульфидной связи, что приводит к увеличению количества свободного β-меркаптоэтанола для восстановления урана (VI).

Влияние температуры на восстановление урана (VI)

Наибольшую степень восстановления можно было наблюдать при значениях температуры от 55°C до 65°C (Фигура 10), что согласуется с оптимальной температурой для роста организма (Kieft et al., 1999). При температурах ниже 45°C наблюдали почти полное отсутствие активности, а при температуре выше 65°C очень высокой была степень химического восстановления урана (VI) β-меркаптоэтанолом в образцах без белка.

Список литературы

Nies, D.H., and Silver, S. (1995) Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. Journal of Industrial Microbiology 14: 186-199.

Lovley, D.R., Phillips, E.J.P., Gorby, Y.A. and Landa, E.R. (1991) Microbial reduction of uranium. Nature. 350:413-416.

Anderson, R.T., Fleisher, M.Q. and LeHuray, A.P. (1998) Concentration, oxidation state, and paniculate flux of uranium in the Black sea. Geochimica et Cosmochimica Acta. 53: 2215-2224.

Rooney-Varga, J, Anderson, R.T., Fraga, J.L., Ringleberg, D. and Lovley, D.R. (1999) Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer. Applied and Environmental Microbiology. 65:3056-3063.

Lovley, D.R., Holmes, D.E. and Nevin, K.P. (2004) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. Advances in Microbial Physiology. 49: 29-286.

Anderson, R.T., Vrionis, H.A., Ortiz-Bemad, I., Resch, C.T., Long, P.E., Dayvault, R., Karp, K., Marutzky, S, Metzler, D.R., Peacock, A., White, D.C., Lowe, M. and Lovley, D.R. (2003) Stimulating the in situ activity of Geobacter species to remove uranium from the groundwater of a uranium-contaminated aquifer. Applied Environmental Microbiology. 69: 5884-5891.

D.R. Lovely and J.R. Lloyd (2000) Microbes with a metal for bioremediation, Nat. Biotechnol. 18, pp.600-601.

Sani, R.K., B. Peyton, W. Smith, W. Apel, and J. Petersen. (2002) Dissimilatory reduction ofCr(VI), Fe(III), and U(VI) by Cellulomonas isolates". Appl. Microbiol. Biotechnol. 60: 192-199.

Van Heerden, E., Opperman, D.J., Bester, P.A., van Marwijk, J., Cason, E.D., Litthauer, D., Piater, L.A. and Onstott, T.C. (2008) Metabolic promiscuity from the deep subsurface: A story of Survival or Superiority. Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 7097:70970s,

Haas, J.R, and Northup, A. (2004) Effects of aqueous complexation on reductive precipitation of uranium by Shewanella putrefaciens. Geochemical Transactions. 5: 41-48.

Kieft, T.L., Fredrickson, J.K., Onstott, T.C., Gorby, Y.A., Kostandarithes, H.M., Bailey, T.J, Kennedy, D.W, Li, S.W., Plymale, A.E., Spadoni, CM. and Gray, M.S. (1999) Dissimilatory reduction of Fe(III) and other electron acceptors by a Thermus isolate. Applied Environmental Microbiology. 65: 1214-221.

Kaufmann, F., and Lovley, D. (2001) Isolation and characterization of a soluble NADPH-dependant Fe(lll) reductase from Geobacter sulfurreducens. Journal of Biotechnology. 183: 4468-4467

Johnson, D.A. and Florence, T.M. (1971) Spectrophotometric determination of uranium(VI) with 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol. Analitica Chimica. Acta. 53: 73-79.

Li, X and Krumholtz X.R. (2009) Thioredoxin is Involved in U(VI) and Cr(VI) Reduction in Desulfovibrio desulfuricans G20. Journal of bacteriology. 191: 4924-4933.

Hua, B., Xu, H., Terry, J. and Deng, B. (2006) Kinteics of uranium(VI) rduction by hydrogen sulphide in anoxic aqu\ueous systems. Environmental Science and Technology. 49: 4666-4671.

Формула изобретения

1. Выделенный полипептид, полученный из штамма SA-01 Thermus scotoductus, который отвечает за восстановление урана (VI) в источнике урана (VI) до урана (IV), где полипептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1.

2. Полипептид по п.1, который отличается тем, что он является гомогенным белком, имеющим молекулярную массу 70 кДа, что показано электрофорезом в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия.

3. Полипептид по п.1, где полипептид, как показал анализ «NCBI BLASTP», является пептид-связывающим белком, ABC-транспортером пептидов.

4. Полипептид по п.1, где источник U (VI) выбран из группы, состоящей из UO_2 $(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ и $UO_2(NO_3)_2$.

5. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид по п.1, включающая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:2.

6. Экспрессирующий вектор, включающий молекулы нуклеиновой кислоты по п.5.

7. Клетка-хозяин для получения/экспрессии белка, включающая вектор по п.6.

8. Способ получения, по меньшей мере, одного полипептида по любому из пп.1-4, который отвечает за восстановление урана (VI) в источнике урана (VI) до урана (IV), который включает стадии:

a) трансфекции молекул нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:2 в клетку-хозяина;

b) культивирования клетки-хозяина для экспрессии полипептида SEQ ID NO:1 в клетке-хозяине; и

c) необязательно, выделения и очистки полипептида SEQ ID NO:1.

9. Применение полипептида SEQ ID NO:1 по любому из пп.1-4 при восстановлении урана (VI) в источнике урана (VI) до (IV).

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> UNIVERSITY OF THE FREE STATE

<120> ISOLATIUM OF A PROTEIN RESPONSIBLE FOR URANIUM (VI) REDUCTION

<130> P40169PC00

<150> ZA2009/06569
<151> 2009-09-21

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 626
<212> PRT
<213> Thermus scotoductus

<400> 1

Met Arg Lys Val Gly Lys Leu Ala Val Phe Gly Leu Ala Ala Leu Gly
1 5 10 15

Leu Ala Leu Ala Gly Pro Gln Asp Asn Ser Leu Val Ile Gly Ala Ser
20 25 30

Gln Glu Pro Arg Val Leu Ala Gly Asp Phe Leu Ser Ile Ile Ser Asn
35 40 45

Gln Ser Ile Lys Leu Glu Ile Glu Gln Tyr Leu Phe Ala Pro Leu Ile
50 55 60

Gly Phe Asn Ala Asn Ser Glu Asn Phe Pro Val Leu Val Thr Glu Val
65 70 75 80

Pro Thr Arg Gln Asn Gly Arg Leu Arg Val Thr Asp Ile Gly Gly Gly
85 90 95

Lys Lys Arg Leu Glu Met Asp Leu Thr Ile Arg Pro Asp Ala Arg Trp
100 105 110

Ser Asp Gly Lys Pro Ile Thr Thr Glu Asp Val Ala Phe Tyr Tyr Glu
115 120 125

Val Gly Lys Ala Lys Gly Met Pro Val Leu Asn Pro Asp Tyr Trp Glu
130 135 140

Arg Val Asn Leu Arg Val Arg Asp Ala Arg Asn Phe Thr Val Ile Phe
145 150 155 160

Glu Pro Ala Tyr Tyr Tyr Asp Thr Tyr Gly Gly Thr Tyr Gly Ser Pro
165 170 175

Ile Gly Tyr Ala Pro Lys His Ile Met Gly Ala Glu Trp Glu Lys Val
180 185 190

Lys Ala Ala Ala Arg Asn Leu Asp Pro Asp Lys Asp Ala Glu Arg Leu
195 200 205

Asn Glu Leu Tyr Arg Asn Phe Phe Leu Lys Phe Ala Thr Pro Gln Ala
210 215 220

Leu Asn Arg Gly Ala Met Val Tyr Ser Gly Ala Phe Lys Leu Arg Arg
225 230 235 240

Trp Val Pro Gly Asn Ser Ile Glu Met Glu Arg Asn Pro Asn Phe Pro
245 250 255

Ile Lys Pro Glu Gly Gly Glu Ser Arg Tyr Val Gln Arg Val Val Tyr
260 265 270

Arg Phe Ile Gln Asn Thr Asn Ser Leu Leu Val Ala Val Leu Gly Gly
275 280 285

Ser Ile Asp Ala Thr Ser Ser Val Ser Leu Thr Phe Asp Gln Gly Arg
290 295 300

Ser Arg Gln Leu Thr Ser Arg Ala Pro Gly Arg Phe Asp Ile Trp Phe
305 310 315 320

Val Pro Gly Ala Ile Trp Glu His Ile Asp Val Asn Lys Phe Glu Asn
325 330 335

Cys Gln Ala Val Arg Asp Leu Gly Leu Asn Asp Val Arg Thr Arg Arg
340 345 350

Ala Leu Leu His Ala Leu Asn Arg Glu Gly Leu Val Lys Ala Phe Phe
355 360 365

Asp Gly Leu Gln Pro Val Ala His Thr Trp Ile Ala Pro Val Asn Pro
370 375 380

Leu Phe Asn Pro Asn Val Arg Lys Tyr Glu Phe Asp Leu Lys Lys Ala
385 390 395 400

Glu Ala Leu Leu Ala Glu Met Gly Trp Arg Lys Gly Pro Asp Gly Ile
405 410 415

Leu Gln Arg Thr Val Gly Gly Arg Thr Val Arg Phe Glu Ile Glu Phe
420 425 430

Val Thr Thr Ala Gly Asn Ala Ile Arg Glu Arg Thr Gln Gln Phe Phe
435 440 445

Ala Glu Asp Leu Lys Lys Ile Gly Ile Ala Val Lys Ile Asn Asn Ala
450 455 460

Pro Ser Ala Val Val Phe Ala Asp Asp Tyr Ile Gln Arg Ala Ser Glu
465 470 475 480

Cys Lys Trp Thr Gly Leu Phe Glu Phe Ala Trp Val Ser Asn Leu Ala
485 490 495

Glu Asp Gly Ser Leu Phe Gln Tyr Lys Asn Leu Asn Thr Gly Ala Ile
500 505 510

Met Val Pro Thr Lys Glu Asn Asn Tyr Gln Gly Gln Asn Ile Gly Gly
515 520 525

Trp Arg Asn Asp Glu Phe Asp Arg Leu Thr Ser Gln Gly Val Leu Glu
530 535 540

Phe Asp Glu Ala Arg Arg Lys Gln Leu Phe Trp Arg Ala Gln Glu Ile
545 550 555 560

Trp Ala Glu Glu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Tyr Phe Arg Ala Asn Pro
565 570 575

Tyr Val Val Arg Lys Gly Leu Val Asn Tyr Val Ala Ser Ala Tyr Ala
580 585 590

Gly Gly Tyr Gly Tyr Pro Gly Trp Asn Ala Trp Glu Ile Gly Trp Glu
595 600 605

Ser Arg Gly Ala Val Lys Lys Trp Asp Gln Ala Lys Tyr Ala Leu Ser
610 615 620

Val Lys
625

<210> 2
<211> 1881
<212> DNA
<213> Thermus scotoductus

<400> 2
atgagaaaag taggcaagct ggctgtattc ggtttagccg ccctgggctt ggccctggcg 60

gggccccagg acaacagcct ggtcataggg gcttcgcagg agccccgggt tctggcgggg 120

gacttcctaa gcatcatctc caaccagtcc atcaagttgg agatcgagca gtacctcttc 180

gccccccctca tcggtttcaa cgccaacagc gaaaactttc ccgtgctggt caccgaggtg 240

cccacccggc aaaacgggcg tttgcgggtg acggacatcg gcgggggcaa gaagcgcttg 300

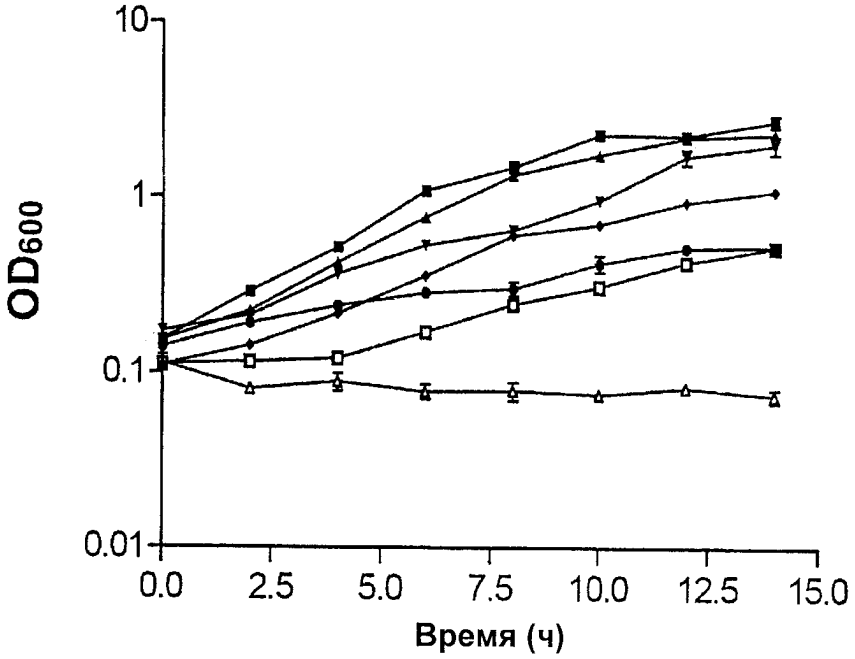
gagatggacc tcaccatccg gcccgatgcc cgctggtccg acggcaagcc catcaccacc 360

gaggatgtgg ccttctacta cgaggtgggc aaggccaagg ggatgccggt gctcaacccg 420

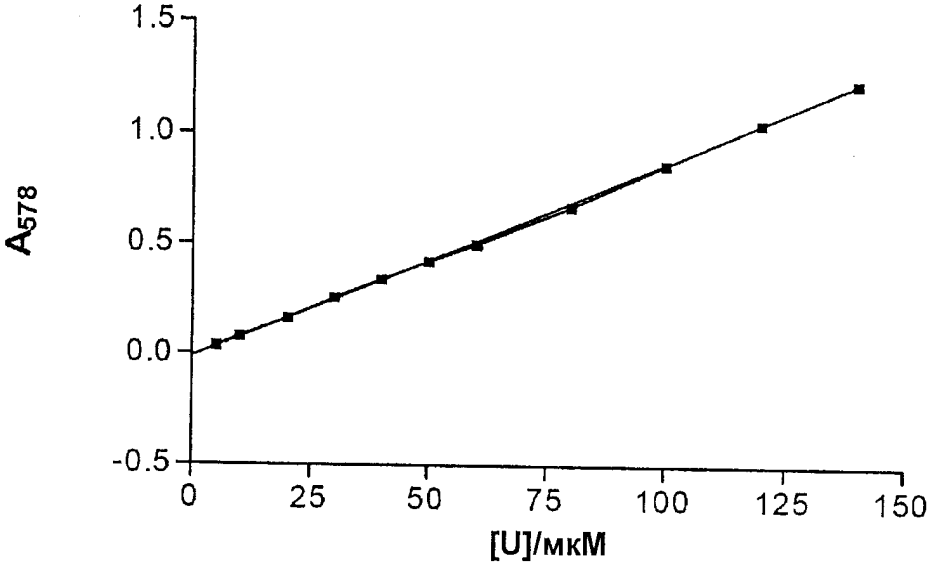
gactactggg agcgggtgaa cctccgggtc agggacgccc gcaacttcac cgtgatcttt 480

gagcccgcct actactacga cacctacggc ggcacctacg gctcccccat cggctacgct 540

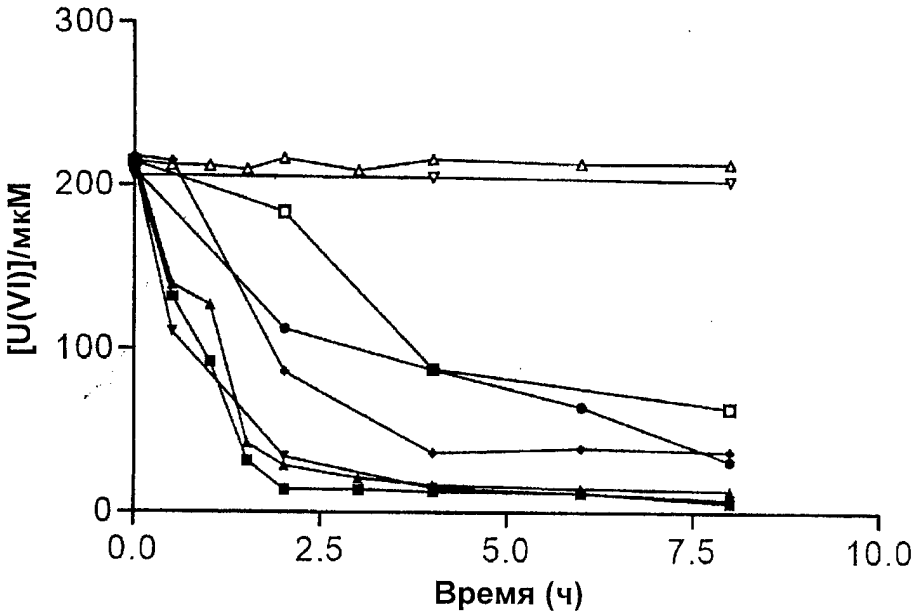
cccaagcaca tcatgggcgc cgagtgggag aaggtgaaag cggcggcccg gaacctggat 600
cccgataagg atgcggagag gctcaacgag ctctaccgca acttcttcct caagttcgcc 660
actccccagg ccctaaaccg gggagccatg gtctactcgg gggccttcaa gctgcggcgc 720
tgggtgccgg ggaactccat tgagatggag cggaacccca acttccccat caagcccgag 780
ggtggggaga gccggtacgt gcagagggtg gtctaccgct tcatccagaa caccaactcc 840
ctcctggtgg ccgtcctggg cgggagcatt gacgccacct ccagcgtctc cctcaccttt 900
gaccaaggcc gtagccgcca gctcacctcc cgggcccctg gccgctttga catctggttc 960
gtgcccgggg ccatctggga gcacattgac gtcaacaagt ttgagaactg ccaggcggtc 1020
cgcgacttgg gcctgaacga cgtccgcacc cgtcgggccc tcctccacgc tctgaaccgc 1080
gaggggttgg tcaaggcctt ctttgacggc ctccagcccg tggcccacac ctggatcgcc 1140
cccgtcaacc ccctcttcaa ccccaatgtg cggaagtacg agtttgacct gaagaaggcg 1200
gaggcgctct tggcggagat gggctggagg aaggggccgg acggcatcct tcagcgcacc 1260
gtgggtggcc gcaccgtgcg ctttgagatt gagttcgtca ccaccgcggg caacgctatc 1320
cgggagcgca cccagcagtt cttcgccgag gacctgaaga agatcggcat cgccgtcaag 1380
atcaataacg cccccagcgc cgtggtcttc gccgacgact acatccagcg ggccagcgag 1440
tgcaagtgga ccgggctgtt tgagttcgct tgggtttcca acctggccga ggatggctcc 1500
ctcttccagt acaagaacct gaacaccggg gccatcatgg tgcccaccaa ggagaacaac 1560
taccaggggc agaacatcgg cggctggcgc aacgacgagt ttgaccgtct gacgagccag 1620
ggtgtcctgg agtttgacga ggccaggcgg aagcagctct tctggagggc ccaggagatc 1680
tgggccgagg agctgcctgc cttgcccctc tacttccgcg ctaaccccta cgtggtgcgg 1740
aagggcctgg tcaactacgt ggccagcgct tacgcgggcg gctacggtta ccccggctgg 1800
aacgcttggg agatcggctg ggagagccgc ggcgccgtga agaagtggga ccaggcgaag 1860
tacgctcttt ccgtcaagta a 1881


10
1
0.1
0.01
OD600
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
15.0
Время (ч)

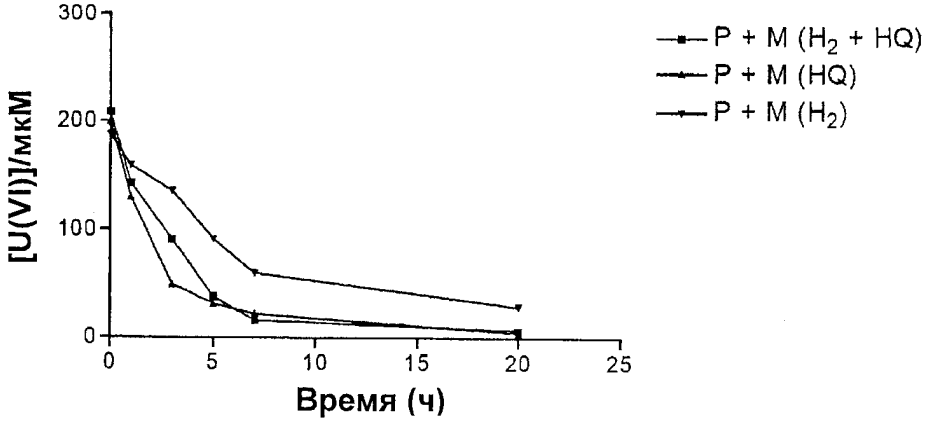
Фиг. 1


1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
A578
0
25
50
75
100
125
150
[U]/мкМ

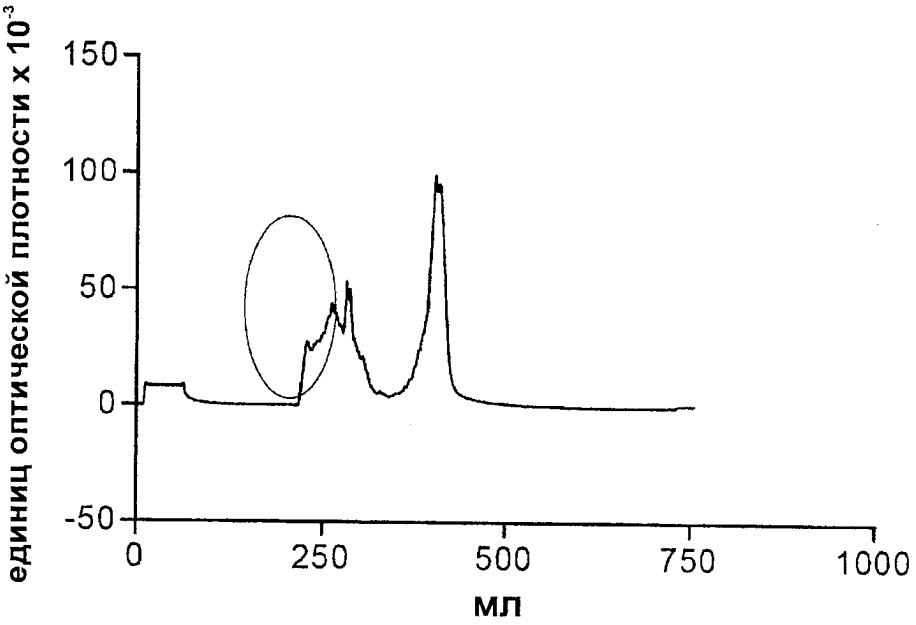
Фиг. 2


300
200
100
0
[U(VI)]/мкМ
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
Время (ч)

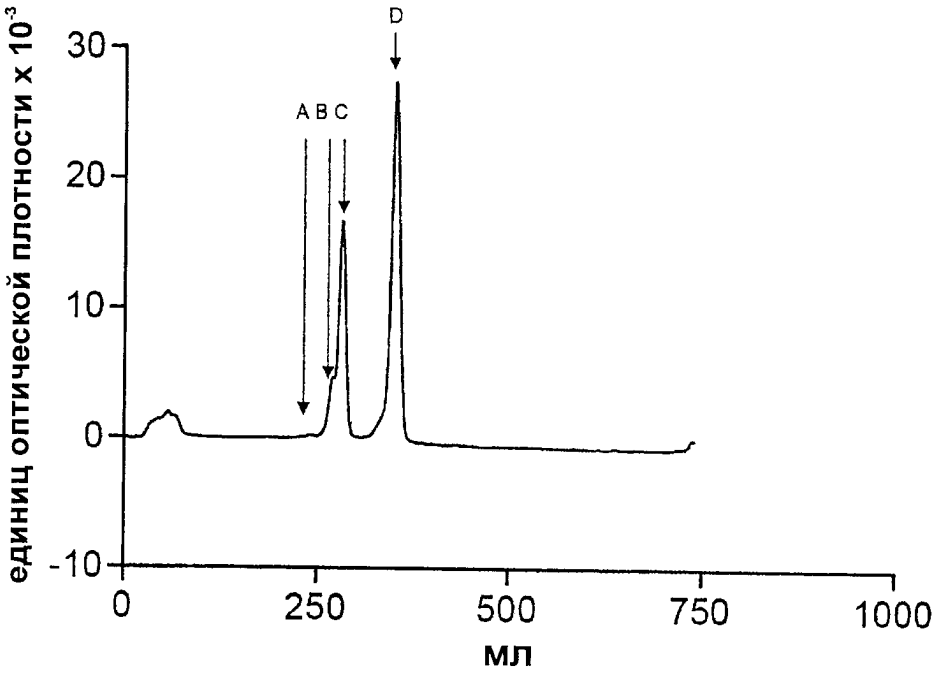
Фиг. 3


300
200
100
0
[U(VI)]/мкМ
0
5
10
15
20
25
Время (ч)
P + M (H2 + HQ)
P + M (HQ)
P + M (H2)

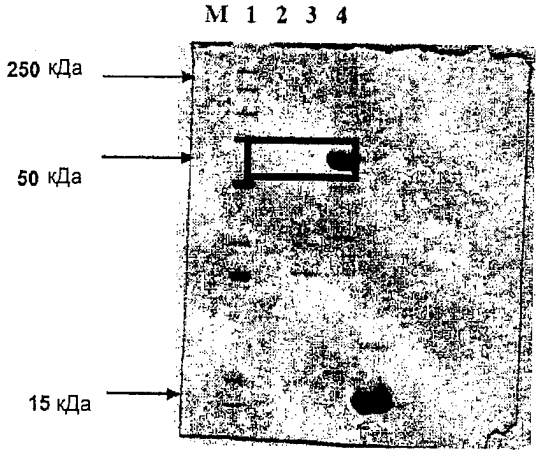
Фиг. 4


единиц оптической плотности x 10-3
150
100
50
0
-50
0
250
500
750
1000
мл

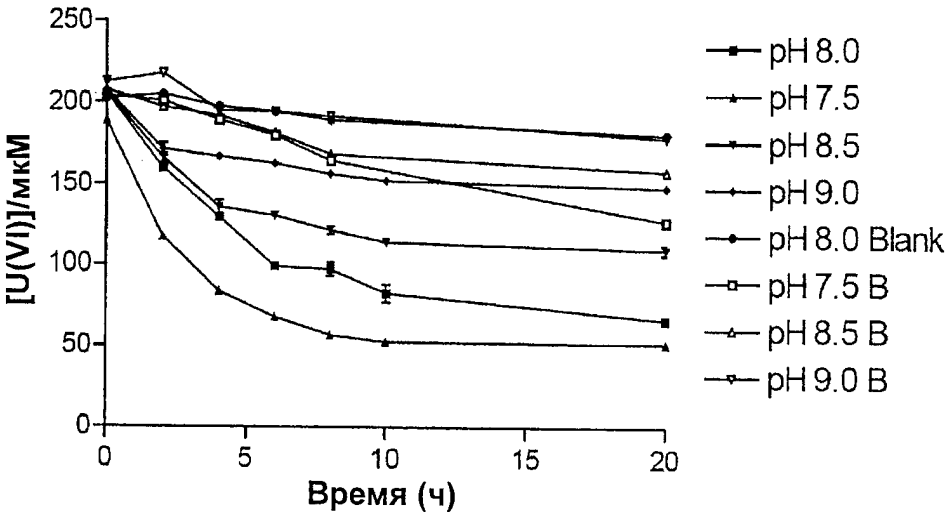
Фиг. 5


единиц оптической плотности x 10-3
30
20
10
0
-10
A B C
D
0
250
500
750
1000
мл

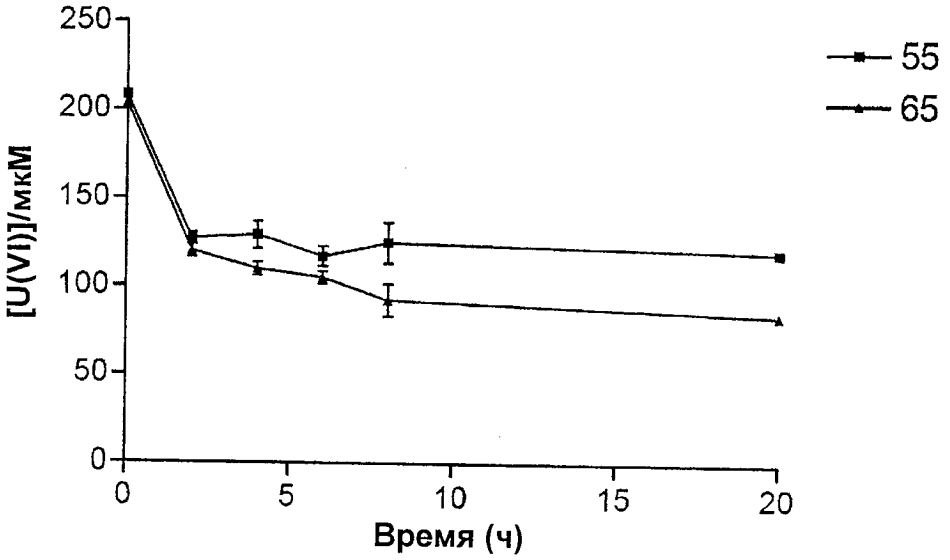
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 9



Фиг. 10