

УДК 575.117.2:579.852.11

**В.А. Прокулевич,**  
доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии БГУ;

**Н.В. Чеписюк,**  
научный сотрудник НИЛ биотехнологии кафедры микробиологии БГУ

## ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО ГЕНА β-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ ПОД КОНТРОЛЕМ P<sub>bio</sub>-ПРОМОТОРА В КЛЕТКАХ *BACILLUS SUBTILIS*

Генетическая изученность, способности синтезировать, а также секретировать в окружающую среду широкий спектр различных биологически активных соединений являются причинами широкого использования бактерии вида *Bacillus subtilis* для целенаправленного конструирования штаммов с заданными свойствами [1]. Это обуславливает необходимость применения экспрессионных систем клонирования генетического материала в данных бактериях. Большая часть применяемых на данный момент систем экспрессии относятся к индуцибельным, то есть для их индукции необходимо добавление в среду культивирования бактерий дорогого индуктора, что является экономически невыгодным. Альтернативой им могут быть системы derepression, не требующие добавления индуктора. Одной из них может стать система экспрессии на основе P<sub>bio</sub>-промотора биотинового оперона бактерий *B. subtilis* [2].

Биотиновый оперон бактерий вида *B. subtilis*, детерминирующий биосинтез биотина, образован шестью структурными генами *bioWAFDBI*, которым предшествует промоторно-операторная область. В конце первого гена оперона *bioW* расположены потенциальные сайты катаболитной репрессии CRE и AbrB. Экспрессия генов биотинового оперона осуществляется за счет P<sub>bio</sub>-промотора и регулируется белком-регулятором BirA, способным свя-

зываться с операторной областью биотинового оперона. Коферментом белка-регулятора BirA является молекула биотина. Таким образом, работа P<sub>bio</sub>-промотора негативно регулируется конечным продуктом био-оперона [3]. В настоящее время сведения об использовании P<sub>bio</sub>-промотора для целенаправленной экспрессии гетерологичного генетического материала в клетках *B. subtilis* в литературе отсутствуют.

Основной целью нашего исследования являлось изучение экспрессии гетерологичного гена под контролем P<sub>bio</sub>-промотора биотинового оперона бактерий *B. subtilis*.

**Материалы и методы исследования.** Характеристики использованных в работе штаммов бактерий и плазмид представлены в таблице 1.

Бактериальные культуры выращивали в жидкой полноценной питательной среде, на плотной полноценной агаризованной питательной среде LB, а также в жидкой минимальной питательной среде и на плотной минимальной агаризованной питательной среде. Трансформацию клеток *B. subtilis* проводили согласно рекомендациям, приведенным в работе S. Bron [7].

Выделение тотальной ДНК проводили саркозильным методом. Выделение плазмидной ДНК осуществляли по стандартной методике щелочного лизиса [8].

**Таблица 1 – Штаммы бактерий и плазмиды, использованные в работе**

Объект	Описание	Источник / ссылка
<i>B. subtilis</i> 168t	Прототроф	[4]
<i>B. subtilis</i> 2W2	<i>erm</i> (Em <sup>r</sup> ), <i>lacZ</i> , <i>lacI</i> в область биотинового оперона встроены вектор pW2	[4]
<i>B. subtilis</i> A2M1	<i>B. subtilis</i> 168t, интеграция pA2M1 в хромосому; <i>erm</i> (Em <sup>r</sup> ), <i>lacZ</i> , <i>lacI</i>	Получен в данной работе
<i>B. subtilis</i> F2.8M	<i>cat</i> (Cm <sup>r</sup> ), <i>erm</i> (Em <sup>r</sup> ), <i>lacZ</i> , <i>lacI</i> , bio <sup>-</sup>	[5]
pW2	<i>bla</i> (Ap <sup>r</sup> ), <i>erm</i> (Em <sup>r</sup> ), P <sub>spac</sub> промотор в pMUTIN4 по сайту <i>HindIII</i> встроены фрагмент BioW1-W4 (8951 п.н.)	[4]
pA2M1	<i>bla</i> (Ap <sup>r</sup> ), <i>erm</i> (Em <sup>r</sup> ), P <sub>spac</sub> в состав вектора pMUTIN4 по <i>HindIII-EcoRI</i> встроены фрагмент плазмиды pBioA2, содержащий ген <i>bioA</i> <i>B. subtilis</i> 168t (10027 п.н.)	[6]

Электрофоретический анализ ДНК осуществляли методами, приведенными в руководстве Маниатис и соавторов [8]. Агарозные гели готовили на основе ТАЕ-буфера с бромистым этидием. Размер фрагментов ДНК устанавливали на основании их электрофоретической подвижности в агарозном геле. В качестве матрицы для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали тотальную ДНК штамма *B. subtilis* A2M1.

Измерение β-галактозидазной активности в клетках бактерий *B. subtilis* проводили по методу Миллера [9].

**Результаты и их обсуждение.** На начальном этапе работы для изучения экспрессии гетерологичного гена под контролем  $P_{bio}$ -промотора биотинового оперона бактерий *B. subtilis* использовали штамм *B. subtilis* 2W2 [4]. Данный штамм был получен нами ранее на основе исходного штамма *B. subtilis* 168t посредством трансформации его плазмидным вектором pW2. Штамм *B. subtilis* 168t не содержит внехромосомных элементов, чувствителен к антибиотикам хлорамфениколу и эритромицину, подвергается трансформации чужеродной ДНК посредством развития у него состояния природной компетентности. Вектор pW2 (8951 п.н.) автономно наследуется в клетках промежуточных хозяев – бактерий *E. coli*, является многокопийным и обеспечивает наработку необходимого количества генетического материала, а также несет гены антибиотикорезистентности к ампициллину и эритромицину для отбора в клетках бактерий *E. coli*. Помимо этого, в состав pW2 входит  $P_{spac}$ -промотор, репортерный ген β-галактозидазы *lacZ* и регуляторный ген *lacI*. В области меж-

ду  $P_{spac}$ -промотором и геном *lacZ* клонирован фрагмент Bio(W1-W4) ДНК хромосомы бактерий *B. subtilis* 168t с RBS-сайтом и N-концевой последовательностью гена *bioW* биотинового оперона. Для бактерий *B. subtilis* pW2 является вектором интеграции, маркером для отбора в клетках бактерий *B. subtilis* служит ген устойчивости к эритромицину. Интеграция данного вектора в хромосому *B. subtilis* происходит за счет процесса одиночной гомологичной рекомбинации между фрагментом Bio(W1-W4) вектора и соответствующим ему участком хромосомы, представленным промоторно-операторной областью биотинового оперона. Интеграция pW2 в хромосому штамма *B. subtilis* 168t приводит к помещению гетерологичного репортерного гена *lacZ* под контроль  $P_{bio}$ -промотора на расстоянии около 400 п.н. от его начала и получению рекомбинантного штамма *B. subtilis* 2W2 [4]. Схематическое строение области биотинового оперона штамма *B. subtilis* 2W2 представлено на рисунке.

При этом ген *lacZ* расположен до потенциальных регуляторных сайтов катаболитной репрессии CRE и AbrB, находящихся в дистальной части первого гена био-оперона *bioW*. Данные последовательности могут оказывать регуляторное воздействие на экспрессию генов в пределах био-оперона. В связи с этим целесообразным являлось изучение возможного влияния данных структур на экспрессию гетерологичного гена под контролем  $P_{bio}$ -промотора. Для этого использовали полученный нами ранее вектор pA2M1 (10027 п.н.) [5]. pA2M1 автономно наследуется в клетках *E. coli*. В составе вектора pA2M1 клонирован структурный ген биотинового оперона *bioA*.

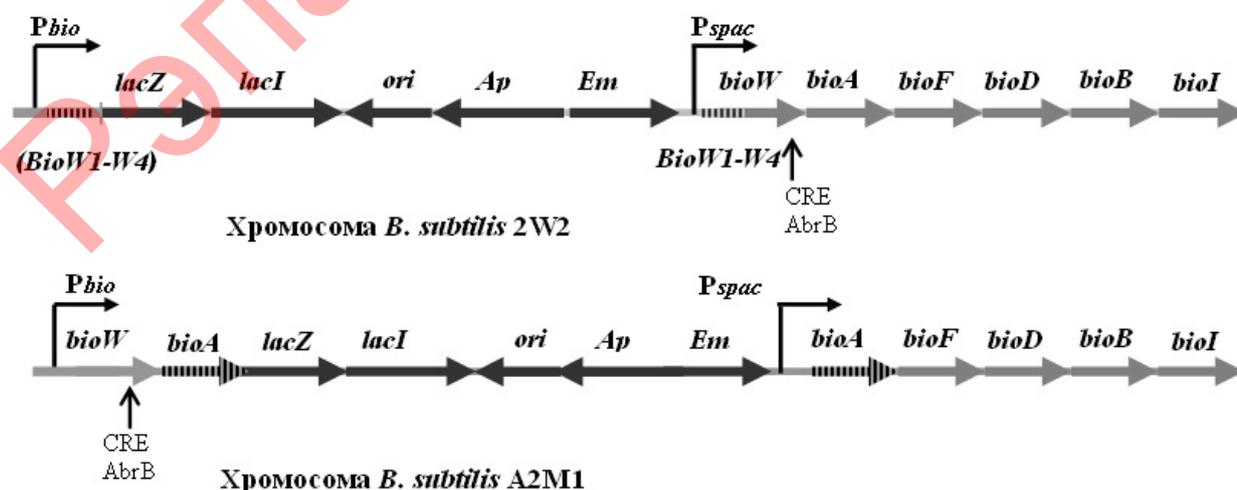


Рисунок – Схематическое изображение строения в области био-оперона в хромосоме бактерий *B. subtilis* 2W2 и *B. subtilis* A2M1

Для бактерий *B. subtilis* pA2M1 является вектором интеграции. Данный вектор ввели в клетки бактерий *B. subtilis* 168t посредством трансформации. В результате этого последовательность pA2M1 интегрировала в хромосому бактерий за счет процесса одиночной гомологичной рекомбинации между геном *bioA* вектора и геном *bioA* хромосомы. Встраивание pA2M1 в хромосому штамма *B. subtilis* 168t привело к помещению гетерологичного репортерного гена *lacZ* под контроль  $P_{bio}$ -промотора и получению рекомбинантного штамма *B. subtilis* A2M1. Наличие и размер фрагментов ДНК, полученных в результате ПЦР, свидетельствуют о рекомбинационном разрыве био-оперона в области гена *bioA* в хромосоме *B. subtilis* 168t и дубликации последовательности данного гена. При этом ген *lacZ* помещается вслед за первой копией гена *bioA*, то есть после потенциальных регуляторных сайтов катаболитной репрессии CRE и AbrB и расположен на расстоянии около 2200 п.н. от начала  $P_{bio}$ -промотора. Схематическое строение области биотинового оперона штамма *B. subtilis* A2M1 представлено на рисунке.

На следующем этапе работы было необходимо проанализировать, а также сравнить характер экспрессии репортерного гена *lacZ* под контролем  $P_{bio}$ -промотора в штаммах *B. subtilis* 2W2 и *B. subtilis* A2M1. Для этого изучили особенности окраски колоний этих штаммов на минимальной плотной агаризованной среде, содержащей хромогенный субстрат X-Gal, с биотином и без него. Как было установлено, при росте на питательной среде без биотина колонии обоих штаммов окрашиваются в синий цвет, при росте же на минимальной среде с биотином окраска утрачивается. Это может свидетельствовать о том, что плазмидный *lacZ*-ген в штаммах *B. subtilis* 2W2 и *B. subtilis* A2M1 транскрибируется за счет  $P_{bio}$ -промотора и находится под негативной регуляцией его экспрессии биотином.

Далее проводили сравнительный количественный анализ активностей  $\beta$ -галактозидазы в штаммах *B. subtilis* 2W2 и *B. subtilis* A2M1 при росте штаммов в жидкой среде с биотином (репрессия) и без него (дерепрессия). Определение активности  $\beta$ -галактозидазы проводили в среде с содержанием биотина: 0,3 нг/мл и 1 нг/мл, а также без него. Активность  $\beta$ -галактозидазы в штамме *B. subtilis* 2W2 без биотина составила

176  $\pm$  17,2 единиц Миллера, для концентраций 0,3 нг/мл и 1 нг/мл — 70,3  $\pm$  7 и 0,8  $\pm$  0,05 единиц Миллера соответственно. В штамме *B. subtilis* A2M1 в условиях дерепрессии показатель активности составил 172,1  $\pm$  16, а в условиях репрессии (1 нг/мл биотина) — 0,76  $\pm$  0,07 единиц Миллера. Таким образом, существенных различий в активностях репортерного белка между двумя штаммами не наблюдалось, что может указывать на отсутствие влияния последовательностей потенциальных регуляторных сайтов катаболитной репрессии CRE и AbrB в дистальной части первого гена био-оперона *bioW* на экспрессию гетерологичного гена под контролем  $P_{bio}$ -промотора при рассмотренных условиях.

В ходе исследования определенным интерес представляла собой возможность сравнения активностей  $P_{bio}$ -промотора с одним из коммерческих промоторов при их функционировании в одинаковых условиях. В качестве такой экспрессионной системы для сравнения был выбран индуцибельный  $P_{spac}$ -промотор, широко применяемый для экспрессии генов в клетках *B. subtilis*. Индуктором данного промотора является изопропил-1-тио- $\beta$ -D-галактопиранозид (ИПТГ). Для такого сравнительного анализа использовали рекомбинантный штамм *B. subtilis* F2.8M, сконструированный нами ранее на основе штамма *B. subtilis* F2.8 и несущий в хромосоме ген  $\beta$ -галактозидазы под контролем  $P_{spac}$ -промотора [9]. Активности  $\beta$ -галактозидазы в штаммах *B. subtilis* 2W2 и *B. subtilis* F2.8M сравнивали при росте бактериальных клеток в минимальной жидкой среде. *B. subtilis* 2W2 культивировали в условиях дерепрессии (без биотина) и в условиях репрессии (биотин 1 нг/мл), *B. subtilis* F2.8M — в минимальной среде с добавлением индуктора ИПТГ в конечной концентрации 0,5 мМ и без индуктора. При этом активность  $\beta$ -галактозидазы для *B. subtilis* F2.8M составила 42,3  $\pm$  4,8 единиц Миллера в среде с индуктором и 0,7  $\pm$  0,03 единиц Миллера в среде без индуктора. Показатель активности в среде с индуктором в 4,3 раза ниже по сравнению с активностью  $P_{bio}$ -промотора в условиях дерепрессии, определенной для штаммов *B. subtilis* 2W2 и *B. subtilis* A2M1. Показатели активности  $\beta$ -галактозидазы в штаммах *B. subtilis* 2W2, *B. subtilis* A2M1 и *B. subtilis* F2.8M представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Активность β-галактозидазы в различных штаммах *B. subtilis*

Штамм	Активность β-галактозидазы (единицы Миллера)			
	с биотином (репрессия) 1 нг/мл	без биотина (дерепрессия)	ИПТГ+ (индукция)	ИПТГ- (без индукции)
<i>B. subtilis</i> 2W2	0,8 ±0,05	176±17,2	–	–
<i>B. subtilis</i> A2M1	0,76 ±0,07	172,1±16	–	–
<i>B. subtilis</i> F2.8M	–	–	42,3±4,8	0,7±0,03

**Заключение.** В хромосоме штаммов *B. subtilis* 2W2 и *B. subtilis* A2M1 гетерологичный ген *lacZ* помещен под контроль  $P_{bio}$ -промотора био-оперона. При этом активность и регуляция работы экзогенным биотином  $P_{bio}$ -промотора сохраняется. Активность промотора является максимальной при культивировании бактерий в среде без добавления биотина. Присутствие биотина в среде в концентрации 0,3 нг/мл приводит к снижению, а в концентрации 1 нг/мл к подавлению его активности. Последовательности потенциальных сайтов CRE и AbrB, расположенные в пределах первого гена био-оперона, не влияют на экспрессию гетерологичного гена, клонированного под контролем  $P_{bio}$ -промотора при рассмотренных условиях. Активность  $P_{bio}$ -промотора в условиях дерепрессии в штамме *B. subtilis* 2W2 выше активности индуцированного  $P_{spac}$ -промотора в штамме *B. subtilis* F2.8M в 4,3 раза.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Schallmey, M. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production / M. Schallmey, A. Singh, O.P. Ward // Can. J. Microbiol. – 2004. – Vol. 50. – P. 1–17.
- Nijland, R. A derepression system based on the *Bacillus subtilis* sporulation pathway offers dynamic control of heterologous gene expression / R. Nijland, J.-W. Veening, O. P. Kuipers // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – Vol. 73, № 7. – P. 2390–2393.
- Streit, W.R. Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production / W.R. Streit, P. Entcheva // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2003. – Vol. 61 – P. 21–31.
- Чеписюк, Н.В. Замена природного промотора биотинового оперона бактерий *Bacillus subtilis* 168t на *spac*-промотор / Н.В. Чеписюк, В.А. Прокулевич // Труды БГУ. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». – 2009. – № 4. – Ч. 2. – С. 158–163.
- Чеписюк, Н.В. The analysis of  $P_{bio}$ -promoter activity / N.V. Chepisiuk // Биология – наука XXI века: 17-я Пушкинская междунар. школа конф. молодых ученых: сб. тезисов, Пушкино, 21–26 апр. 2013 г. / ПНЦ РАН. – Пушкино, 2013. – С. 58–59.
- Чеписюк, Н.В. Клонирование структурного гена биотинового оперона *bioA* бактерий *Bacillus subtilis* 168t / Н.В. Чеписюк, В.А. Прокулевич // Труды БГУ. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». – 2008. – № 3. – Ч. 1. – С. 65–70.
- Bron, S. Plasmids // Molecular Biological Methods for *Bacillus* / S. Bron; ed. Harwood C.R. Chichester: John Wiley and Sons Ltd, 1990. – P. 75–174.
- Маниатис, Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 479 с.
- Миллер, Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / Дж. Миллер. – М.: Мир, 1976. – 440 с.

#### SUMMARY

Vectors *pW2* and *pA2M1* are integration vectors for *B. subtilis* and allow heterologous gene cloning under the control of  $P_{bio}$ -promoter, that results in recombinant strains *B. subtilis* 2W2 and *B. subtilis* A2M1 construction. The details of β-galactosidase expression under the control of  $P_{bio}$ -promoter as a function of various biotin concentrations in the growth medium have been studied. A comparative analysis of  $P_{bio}$ -promoter and  $P_{spac}$ -promoter under the same conditions has been carried out.

Поступила в редакцию 18.06.2014 г.