

УДК 577.21:579.852.11

Н.В. Чеписюк,

научный сотрудник НИЛ биотехнологии кафедры микробиологии БГУ

ДВУХКОМПОНЕНТНАЯ ИНТЕГРАТИВНАЯ СИСТЕМА КЛОНИРОВАНИЯ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS*

Бактерии *Bacillus subtilis* широко применяются в лабораторной практике для изучения физиологических механизмов бактериальной клетки, молекулярно-генетических исследований, процессов споруляции, клеточного цикла. В биотехнологическом производстве они занимают второе место после *E. coli* среди бактерий по частоте создания на их основе продуцентов различных биологически активных веществ [1]. В настоящее время предпочтительным является использование бесплазмидных штаммов-продуцентов. При конструировании таких штаммов на первоначальном этапе осуществляется создание векторов интеграции, содержащих целевые гены. Далее осуществляется их введение в хромосому бактерии-хозяина за счет механизма рекомбинационной интеграции [2].

Основной целью нашего исследования являлось конструирование двухкомпонентной интегративной системы для множественного экспрессионного клонирования гетерологичных генов в клетках бактерий *B. subtilis*.

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

Таблица – Штаммы бактерий и плазмиды, использованные в работе

Объект	Описание	Источник / ссылка
<i>B. subtilis</i> 2W2	<i>erm</i> (Em ^r), <i>lacZ</i> , <i>lacI</i> в область биотинового оперона встроены вектор pW2	[3]
<i>B. subtilis</i> WCSP	<i>B. subtilis</i> 2W2, интеграция pCSP в хромосому; <i>cat</i> (Cm ^r), <i>erm</i> (Em ^r), <i>lacZ</i> , <i>lacI</i>	Получен в данной работе
<i>B. subtilis</i> WBRS	<i>B. subtilis</i> 2W2, интеграция pBRS в хромосому; <i>cat</i> (Cm ^r), <i>erm</i> (Em ^r), <i>lacZ</i> , <i>lacI</i>	-/-
<i>E. coli</i> XL1-Blue	F ['] proABlacI ^q lacZΔM13Tn10(Tet ^r)/recA1endA1gyrA96 (Nal ^r)thi1R17 (r _k m ⁺ _k)supE44relA1lac	[4]
pMUTIN4	<i>bla</i> (Ap ^r), <i>erm</i> (Em ^r), <i>rep</i> (pMB1), <i>lacZ</i> , P _{spac} (8610 п.н.)	[5]
pMTL21C	<i>lacZ</i> , Cm ^r Ap ^r , <i>rep</i> (pMB1) (3345 п.н.)	[6]
pBR322	<i>bla</i> (Ap ^r), <i>tet</i> (Tc ^r), <i>rop</i> , <i>rep</i> (pMB1) (4361 п.н.)	[7]
pMTL21CspII	<i>cat</i> (Cm ^r), <i>bla</i> (Ap ^r), <i>rep</i> (pMB1), P _{spac} (4458 п.н.)	[8]
pCSP	<i>cat</i> (Cm ^r), <i>bla</i> (Ap ^r), P _{spac} промотор в вектор pMTL21C встроены <i>Pst</i> I/ <i>Sma</i> I-фрагмент pMUTIN4 размером 614 п.н. (4109 п.н.)	Получена в данной работе
pBRS	<i>cat</i> (Cm ^r), <i>bla</i> (Ap ^r), P _{spac} в вектор pBR322 встроены <i>Eco</i> RI-фрагмент pMTL21CspII (7111 п.н.)	-/-

Бактериальные культуры выращивали в жидкой полноценной питательной среде, а также на плотной агаризованной питательной среде LB.

Для трансформации бактерий *E. coli* плазмидной ДНК использовали методику кальциевой трансформации [9]. Трансформацию клеток *B. subtilis* проводили согласно рекомендациям, приведенным в работе S. Bron [10].

Выделение тотальной ДНК проводили саркозильным методом. Выделение плазмидной ДНК осуществляли по стандартной методике щелочного лизиса [9]. Рестрикцию плазмидной ДНК и последующее лигирование фрагментов осуществляли в условиях, рекомендуемых фирмой-изготовителем «MBI Fermentas». Электрофоретический анализ ДНК осуществляли методами, приведенными в руководстве Маниатис и соавторов [9]. Агарозные гели готовили на основе TAE-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* WCSP и *B. subtilis* WBRS.

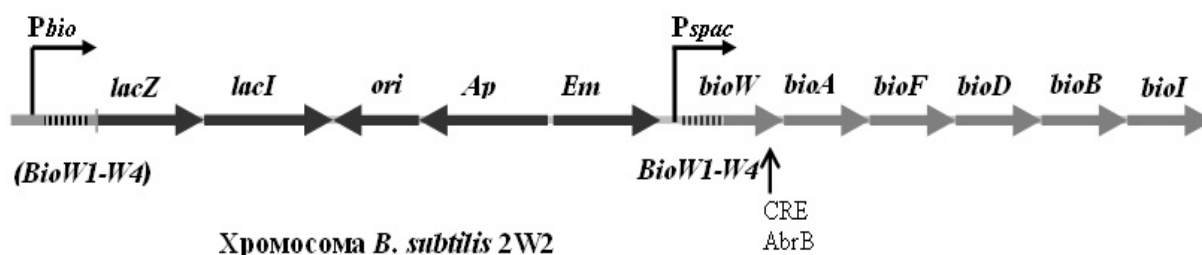


Рисунок 1 – Схематическое изображение строения области био-оперона в хромосоме бактерий *B. subtilis* 2W2

Результаты и их обсуждение. Направленность применения создаваемой системы именно для множественного клонирования обуславливает наличие в ней более одного компонента, или структурного элемента. Ранее в ходе экспериментальной работы нами был получен вектор pW2, а также штамм *B. subtilis* 2W2, которые являются первым элементом системы и обеспечивают клонирование гетерологичного генетического материала в хромосоме штамма-хозяина под контролем P_{bio} -промотора [3]. Схематическое строение области биотинового оперона штамма *B. subtilis* 2W2 представлено на рисунке 1.

Изучены также особенности работы данной экспрессионной системы при различных условиях культивирования *B. subtilis* 2W2 [11]. Однако множественное клонирование генетического материала под контролем экспрессионной системы, отличной от P_{bio} -промотора, в клетках бактерий *B. subtilis* 2W2 предполагает создание второго компонента системы. Им может стать вектор или ряд векторов, обеспечивающих достижение необходимого результата.

Векторы, предназначенные для экспрессионного клонирования гетерологичных генов в клетках *B. subtilis* 2W2, как компоненты системы должны отвечать ряду требований. А именно: наследоваться в *E. coli*, быть способными интегрировать в хромосому *B. subtilis* 2W2, иметь селективный маркер, а также систему регулируемой экспрессии гетерологичных генов в *B. subtilis*. Для создания элементов второго компонента системы, которые отвечали бы вышеуказанным требованиям, нами было решено взять за основу плазмиды, широко применяемые в генно-инженерном конструировании при работе с бактериями *E. coli*, а именно: pMTL21C и pBR322.

В качестве регулируемой экспрессионной системы для обеспечения экспрессии допол-

нительного генетического материала в клетках *B. subtilis* 2W2, отличной от P_{bio} -промотора, было решено использовать индуцируемый P_{spac} -промотор. При этом ген-регулятор работы данного промотора *lacI* также входит в состав интегрированной pW2. Индуктором данного промотора является изопропил-1-тио- β -D-галактопиранозид (ИПТГ). Ген устойчивости к хлорамфениколу, хлорамфениколацетилтрансфераза (*cat*), может выступать как генетический маркер, необходимый для отбора трансформантов *B. subtilis* 2W2, несущих встроенные в хромосому векторы.

Один из векторов интеграции конструировали на основе плазмиды pMTL21C. Данная плаزمида содержит репликон pMB1 и в клетках бактерий *E. coli* является многокопийной. Она имеет также детерминанты антибиотикорезистентности к ампициллину и хлорамфениколу. В клетках *E. coli* способны экспрессироваться гены β -лактамазы (*bla*) и *cat*, а в *B. subtilis* – только ген *cat*. В состав вектора было необходимо ввести последовательность P_{spac} -промотора в качестве экспрессионной системы, которая обеспечивала бы экспрессию дополнительного гетерологичного генетического материала. Источником необходимой последовательности ДНК служила плаزمида pMUTIN4. Плазмидную ДНК pMUTIN4 обрабатывали рестриктазами *Pst*I и *Sma*I. Полученный фрагмент ДНК размером 614 п.н., содержащий P_{spac} -промотор, выделяли из геля и лигировали с вектором pMTL21C, обработанным теми же рестриктазами. При этом клонирование целевого фрагмента осуществлялось в область полилинкера pMTL21C. Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* XL1-Blue. Отбор трансформированных бактерий осуществляли на плотной полноценной питательной среде с ИПТГ, X-gal и ампициллином. Рестрикционный анализ плазмидных ДНК, выделенных из трансформантов, позволил отобрать бактерии *E. coli* XL1-Blue, несущие

плазмиду рМТL21С с клонированным в ней *Pst*I-*Sma*I-фрагментом. Данную конструкцию обозначили как рСSP (4109 п.н.). Схематическое изображение вектора рСSP представлено на рисунке 2.

Таким образом, вектор рСSP имеет маркер для работы с ним в клетках *B. subtilis*, а также P_{spac} -промотор для экспрессии чужеродного генетического материала. Этап интеграции данного вектора в хромосому мог бы обеспечиваться наличием областей гомологии между ним и последовательностью вектора рW2, встроенного в хромосому штамма *B. subtilis* 2W2. Такими областями гомологии являются: ген β -лактамазы (*bla*), P_{spac} -промотор, также репликон рМВ1. Гомологичность данных участков обусловлена общностью их происхождения и подтверждается результатами сопоставления их нуклеотидных последовательностей.

При клонировании ряда генов в клетках *E. coli* в составе многокопийных векторов исследователи нередко сталкиваются с проблемой токсического эффекта или метаболической перегрузки клеток, причиной чего, как правило, являются белковые продукты клонируемого генетического материала [12]. Одним из решений данной проблемы является использование малокопийных векторов на стадии генетического конструирования в клетках данных бактерий. К таким векторам относится плаزمида рBR322 (4361 п.н.). Данная плаزمида способна наследоваться в клетках *E. coli* за счет рМВ1-репликона. Продукт *rop* гена, входящего в состав плазмиды, регулирует процесс ее репликации, в результате чего копияность рBR322 в клетках *E. coli* составляет около 20–70 копий на клетку [7]. Плазмида содержит гены устойчивости к ампициллину и тетрациклину, способные экспрессироваться в *E. coli*. В клетках *B. subtilis*

данная плаزمида не способна к автономной репликации, однако имеет области гомологии с вектором-хелпером рW2. Получение вектора эктопической интеграции для экспрессионного клонирования в клетках *B. subtilis* 2W2 на основе рBR322 предполагало введение в состав плазмиды гена устойчивости к хлорамфениколу в качестве генетического маркера для клеток *B. subtilis*, а также последовательности P_{spac} -промотора в качестве экспрессионной системы. Наиболее удобным источником необходимой последовательности ДНК служила плазмида рМТL21СspII (4458 п.н.). рМТL21СspII является производной рМТL21С и содержит в своем составе P_{spac} -промотор и ген хлорамфениколацетилтрансферазы. Плазмидную ДНК рМТL21СspII обработали рестриктазой *Eco*RI. Далее, *Eco*RI-фрагмент, содержащий P_{spac} -промотор и маркер антибиотикорезистентности к хлорамфениколу, ввели в состав плазмиды рBR322 по сайтам распознавания этой же рестриктазы. Препарат ДНК рBR322, рестрицированный по сайту действия рестриктазы *Eco*RI, перед лигированием со вставкой обрабатывали фосфатазой. Лигазной смесью трансформировали клетки бактерий *E. coli* XL1-Blue. Отбор трансформированных бактерий осуществляли на плотной полноценной питательной среде с добавлением ампициллина и хлорамфеникола. В результате клонирования была получена рекомбинантная плазмида рBRS (7111 п.н.). Рестрикционный анализ плазмидных ДНК рBRS, выделенных из трансформантов, позволил определить прямую ориентацию клонированного *Eco*RI-фрагмента, содержащего P_{spac} -промотор, и гена устойчивости к хлорамфениколу, относительно гена устойчивости к тетрациклину. Схематическое изображение вектора рBRS представлено на рисунке 2.

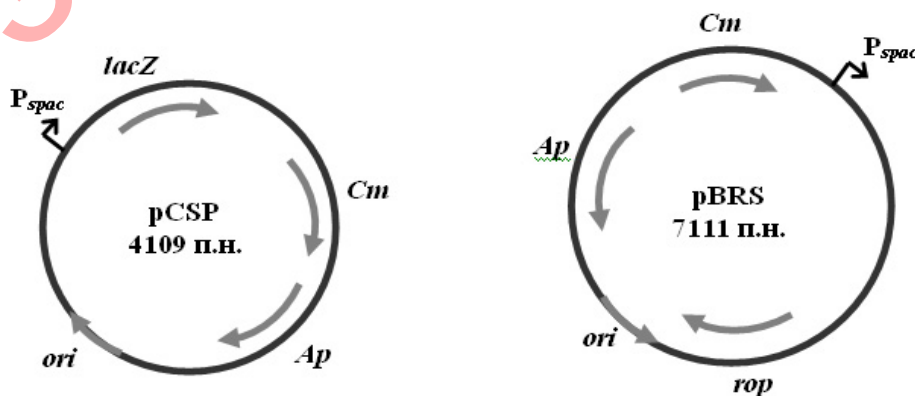


Рисунок 2 – Схема рекомбинантных плазмид рСSP и рBRS

Таким образом, вектор pBRS имеет маркер для работы с ним в клетках *B. subtilis*, а также P_{spac} -промотор для экспрессии чужеродного генетического материала. Интеграция данного вектора в хромосому могла бы обеспечиваться наличием областей гомологии между ним и последовательностью вектора pW2, встроенного в хромосому штамма *B. subtilis* 2W2. К ним относятся: ген *bla*, P_{spac} -промотор и репликон pMB. Гомологичность данных участков также обусловлена общностью их происхождения и подтверждается результатами сопоставления их нуклеотидных последовательностей.

Как отмечалось ранее, первым компонентом конструируемой интегративной системы клонирования является вектор pW2. Векторы эктопической интеграции pCSP и pBRS являются вторым компонентом системы клонирования и также должны обеспечивать интеграцию генетического материала в хромосому штамма-хозяина.

Плазмидную ДНК векторов pCSP (4109 п.н.) и pBRS (7111 п.н.) использовали для трансформации клеток штамма *B. subtilis* 2W2. Данные плазмиды содержат области гомологии с хромосомой штамма-хозяина. При трансформации и введении в клетки штамма *B. subtilis* 2W2 плазмид pCSP и pBRS последовательности ДНК плазмид интегрируют в состав хромосомы за счет гомологичной рекомбинации между последовательностью ДНК плазмид и гомологичными областями в составе плазмиды pW2, встроенной в хромосому. При этом бактерии-трансформанты с такой интеграцией приобретают устойчивость к хлорамфениколу, поэтому отбор трансформантов осуществляли на плотной полноценной питательной среде с добавлением хлорамфеникола. О встраивании плазмид в хромосому штамма *B. subtilis* 2W2 судили также по результатам ПЦР-анализа тотальной ДНК, выделенной из клонов-трансформантов.

Результаты полимеразной цепной реакции, проведенной с использованием праймеров к гену устойчивости к хлорамфениколу, а также праймеров к последовательности P_{spac} -промотора, свидетельствовали об интеграции плазмид pCSP и pBRS в хромосому *B. subtilis* 2W2.

Рекомбинантные штаммы, полученные на основе штамма *B. subtilis* 2W2, посредством интеграции в его хромосому плазмид pCSP и pBRS получили наименования *B. subtilis* WCSP и *B. subtilis* WBRS соответственно. В хромосомах данных штаммов со-

вмещены оба компонента интегративной системы клонирования.

Заклучение. В результате работы сконструированы векторы pCSP размером 4109 п.н. и pBRS размером 7111 п.н., характеризующиеся различным числом копий в клетках *E. coli* и являющиеся векторами интеграции для клеток бактерий *B. subtilis* 2W2. pCSP и pBRS имеют P_{spac} -промотор для экспрессии генов в клетках *E. coli* и *B. subtilis*. Установлено, что вектор pW2, находящийся в интегрированном состоянии в хромосоме штамма *B. subtilis* 2W2, обеспечивает интеграцию ДНК векторов pCSP и pBRS в хромосому штамма *B. subtilis* 2W2. Сконструированная в результате работы векторная система предназначена для множественного экспрессионного клонирования гетерологичных генов в клетках бактерий *B. subtilis*.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Development of a New Integration Site within the *Bacillus subtilis* Chromosome and Construction of Compatible Expression Cassettes / B. Hartl [et al.] // J. Bacteriol. – 2001. – Vol. 183. – P. 2696–2699.
3. 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.
4. Bullock, W.O. XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection / W.O. Bullock, J.M. Fernandez, J.M. Stuart // Bio. Technology. – 1987. – Vol. 5 – P. 376–379.
5. Vagner, V. A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis* / V. Vagner, E. Dervyn, S.D. Ehrlich // J. Microbiol. – 1998. – Vol. 144, № 11. – P. 3097–3104.
6. The pMTL *nic*-cloning vectors. I. Improved pUC polylinker regions to facilitate the use of sonicated DNA for nucleotide sequencing / S.P. Chambers [et al.] // Gene. – 1988. – Vol. 68, № 1. – P. 139–149.
7. Construction and Characterization of New Cloning Vehicles V. Mobilization and Coding Properties of pBR322 and Several Deletion Derivatives Including pBR327 and pBR328 / Covarrubias [et al.] // Gene. – 1981. – Vol. 13, № 1. – P. 25–35.
8. Чеписюк, Н.В. Создание векторов интеграции для использования в клетках *Bacillus subtilis* / Н.В. Чеписюк, В.А. Прокулевич // Материалы науч. конф., посвящ. 45-летию основания Института генетики и цитологии НАН, Минск, 25–29 октября 2010 г. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А.В. Кильчевский [и др.]. – Минск, 2010. – С. 122.

9. Маниатис, Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 479 с.
10. Bron, S. Plasmids // *Molecular Biological Methods for Bacillus* / S. Bron; ed. Harwood C.R. Chichester: John Wiley and Sons Ltd. – 1990. – P. 75–174.
11. Чеписюк, Н.В. Создание вектора интеграции для бактерий *Bacillus subtilis* 2W2 / Н.В. Чеписюк // Труды БГУ. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем» – 2011. – № 6. – Ч. 2. – С. 110–115.
12. Jones, K.L. Low-Copy Plasmids Can Perform as Well as or Better than High-Copy Plasmids for Metabolic Engineering of Bacteria / K.L. Jones, S.W. Kim, J.D. Keasling // *Metabolic Engineering*. – 2000. – Vol. 2, № 4. – P. 328–338.

SUMMARY

The two-component system of heterologous genes integrative cloning in bacteria *Bacillus subtilis* consists of two components. The first component is integration vector *pW2*, capable of incorporating into *B. subtilis* biotin operon, that results in recombinant strain *B. subtilis* 2W2 construction. The second component of the system is represented by plasmid vectors *pCSP* and *pBRS*. Vector *pCSP* is a high-copy plasmid for *E. coli*. Plasmid *pBRS* is a low-copy vector. Both vectors have homologous regions with vector *pW2* and inducible *Pspac*-promoter. *pCSP* and *pBRS* integration into *B. subtilis* 2W2 chromosome is due to recombination between homologous vector sequences and *pW2* incorporated into the biotin operon of *B. subtilis* 2W2.

Поступила в редакцию 18.06.2014 г.

Резюме