

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА *BIOA* *METHYLOBACILLUS FLAGELLATUM* В КЛЕТКАХ *BACILLUS SUBTILIS*

Н.В. Чеписюк, В.А. Прокулевич

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

Биотин (витамин Н) обладает высокой физиологической активностью. Являясь кофактором ферментов, осуществляющих реакции карбоксилирования и транскарбоксилирования, он участвует во многих обменных процессах [1]. Помимо этого, для биотина и его витамеров установлена роль в регуляции транскрипции ряда генов. Получение биотина в коммерческих целях осуществляется путем химического синтеза, который отличается рядом существенных недостатков, таких как высокие затраты энергии и образование большого количества различных токсических соединений [2]. Широкое применение биотина в косметической, пищевой промышленности, сельском хозяйстве и медицине обуславливает необходимость его крупномасштабного производства с помощью биотехнологических методов, что подразумевает создание штаммов, характеризующихся повышенной продукцией данного соединения.

В настоящее время организация и регуляция генов биосинтеза биотина исследована у таких микроорганизмов, как *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Kurthia sp.*, *Methylobacillus flagellatum*. Организация генов биосинтеза биотина у *M. flagellatum* в существенной степени сходна с *E. coli* и состоит из генов оперона *bioB*, *bioF*, *bioH*, *bioC* и *bioD* с правонаправленной транскрипцией, а так же отдельно транскрибируемого гена *bioA*, который расположен на расстоянии 12 мин генетической карты *M. flagellatum* от *bio*-оперона [3] (рисунок 1).

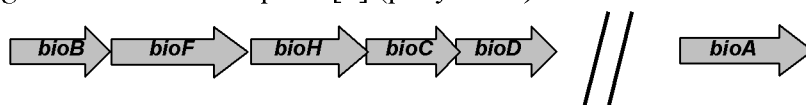


Рисунок 1 – Последовательность расположения генов биосинтеза биотина в хромосоме *Methylobacillus flagellatum*

Одними из наиболее перспективных продуцентов биотина считаются бактерии вида *B. subtilis*. Путь биосинтеза биотина в клетках этих бактерий довольно подробно изучен Бовером и Перкинсом [4]. Оперон *B. subtilis*, детерминирующий биосинтез биотина (*bio*-оперон), образован шестью структурными генами *bioWAFDBI*, которым предшествует промоторно-операторная область (рисунок 2).

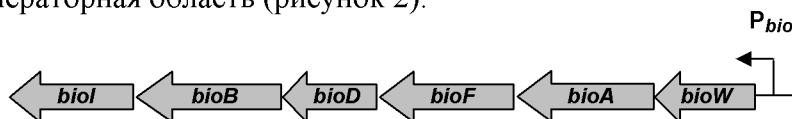


Рисунок 2 – Последовательность расположения генов биосинтеза биотина в хромосоме *Bacillus subtilis*

Каждый из структурных генов отвечает за определенный этап последовательного биосинтеза молекулы биотина. Регуляция данного процесса происходит на уровне транскрипции генов [5]. Третья стадия пути биосинтеза биотина представляет собой превращение 7-оксо-8-аминопеларгоновой кислоты в 7,8-диаминопеларгоновую кислоту (ДАРА). В клетках бактерий *B. subtilis* диаминопеларгоновая кислота образуется в результате реакции переаминирования, катализируемой аминотрансферазой, или ДАРА-синтетазой. Донором аминокислотной группы является лизин. Помимо лизина, ДАРА-синтетаза *B. subtilis* в качестве аминокислотного донора способна использовать также (S)-2-аминоэтил-L-цистеин в присутствии кофактора фермента пиридоксальфосфата [4].

Этап превращения 7-оксо-8-аминопеларгоновой кислоты в 7,8-диаминопеларгоновую кислоту, контролируемый *bioA*-геном, является одной из лимитирующих стадий процесса биосинтеза биотина [4]. Снятия лимитирующего эффекта данной стадии можно достигнуть за счет увеличения числа копий гена *bioA* в хромосоме. При этом целесообразным является повышение в клетке микроорганизма-хозяина копий не только собственного гена, но и введение в клетки гетерологичных генов биосинтеза биотина. Для этого необходимо иметь векторную молекулу, несущую гетерологичный ген *bioA*, способный к независимой экспрессии в клетках бактерий *B. subtilis*.

Целью данной работы являлось введение в составе интегративного вектора гена *bioA* биотинового оперона бактерий *M. flagellatum* в хромосому бактерий штамма *B. subtilis* 4WN5.

Методы исследования

Характеристики использованных в работе штаммов бактерий и плазмид представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Штаммы бактерий и плазмиды, использованные в работе

| Объект | Описание | Источник /ссылка |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| <i>E. coli</i> DH5- α | F– <i>gyrA96</i> (Nal ^r) <i>recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i> (rk–mk +) <i>glnV44 deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169</i> [ϕ 80d Δ (<i>lacZ</i>) <i>M15</i>] | [6] |
| <i>B. subtilis</i> 4WN5 | Em ^r , замена природного <i>bio</i> -промотора на <i>spac</i> -промотор | [7] |
| <i>E. coli</i> K-12 R879 | <i>bioA</i> ^r | [8] |
| pNCL2 | Ap ^r , Sm ^r . RepRSF1010, <i>tac</i> -промотор, <i>bioBFHCDA M. flagellatum</i> | [9] |
| pBR322 | Ap ^r , Tc ^r . Rep(pMB1), <i>gor</i> (4361 п.н.) | [10] |
| pBR2a | Ap ^r . Rep(pMB1), <i>gor</i> в вектор pBR322 встроен ген <i>bioA M. flagellatum</i> | Данная работа |
| pMTL21CspII | Ap ^r , Cm ^r . Rep(pMB1), <i>spac</i> -промотор | [11] |
| pBR2asp | Ap ^r , Cm ^r . Rep(pMB1), <i>gor</i> в вектор pBR2a встроен EcoRI-фрагмент pMTL21CspII, содержащий <i>spac</i> -промотор и маркер Cm ^r | Данная работа |

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 [12]. Трансформацию клеток *B. subtilis* проводили согласно рекомендациям, приведенным в работе S. Bron [13].

Выделение плазмидной ДНК осуществляли по стандартной методике щелочного лизиса [12].

Рестрикцию плазмидной ДНК и последующее лигирование фрагментов осуществляли в условиях, рекомендуемых фирмой изготовителем «MBI Fermentas» (Литва). Электрофоретический анализ ДНК осуществляли методами, приведенными в руководстве Маниатис и соавт. [12]. Агарозные гели готовили на основе ТАЕ-буфера с бромистым этидием. Размер фрагментов ДНК устанавливали на основании их электрофоретической подвижности в агарозном геле.

Аmplификацию фрагментов ДНК проводили с использованием набора реактивов TaKaRa Ex TaqTM (Япония). Для амплификации фрагментов ДНК, соответствующих гену *bioA*, использовали пару олигодезоксирибонуклеотидных праймеров: *bioA1* и *bioA2*:

bioA1 5' – GG GGTACCAAGGAGGCATTCATGACAACGAGTAAC –3'

bioA2 5' – GGGGATCCTCATAGGCTTTCCTCCA –3'

Полимеразную цепную реакцию проводили при следующих параметрах: 94°C – 5 минут (один цикл); 94°C – 30 секунд, 53°C – 30 секунд, 68°C – 1 минута 30 секунд (30 циклов); 68°C – 10 мин (один цикл). В качестве матрицы для проведения полимеразной цепной реакции использовали плазмиду pNCL2.

Комплементационный тест проводили посредством трансформации бактерий штамма *E. coli* K12 R879 (*bioA*) с последующим высевом полученных трансформантов на минимальную глюкозо-солевую среду без биотина.

Результаты и обсуждение

Ген *bioA* является одним из шести структурных генов биотинового оперона бактерий *M. flagellatum*, который, как указывалось ранее, расположен на расстоянии и транскрибируется отдельно от генов *bioBFHCD* био-оперона (см. рисунок 1). В ходе работы данный ген амплифицировали с помощью соответствующих праймеров. В качестве матрицы использовали плазмиду pNCL2, несущую в своем составе биотиновый оперон бактерий *M. flagellatum*. Для обеспечения возможности дальнейшей экспрессии гена в клетках бактерий вида *B. subtilis* в состав праймера bioA1 введена специфическая последовательность RBS-сайта и старт-кодон, а в состав праймера bioA2 – стоп-кодон, а также последовательность сайта действия рестриктазы *Bam*HI. Размер продукта ПЦР составил около 1300 п.н. Далее полученный фрагмент клонировали в клетках бактерий *E. coli* DH5- α с использованием вектора pBR322. ДНК продукта полимеразной цепной реакции обрабатывали рестриктазой *Bam*HI, ДНК вектора – рестриктазами *Bam*HI и *Eco*RV. Клонирование в указанные сайты приводит к инаktivации в pBR322 маркера антибиотикорезистентности к тетрациклину. Трансформантов, содержащих плазмиду с клонированным геном *bioA*, отбирали по признаку устойчивости к ампициллину и чувствительности к тетрациклину. Полученную рекомбинантную плазмиду обозначили как pBR2a.

Для обеспечения в дальнейшем экспрессии клонированного гена в клетках бактерий вида *B. subtilis* было необходимо поместить последовательность гена в составе pBR2a под контроль промотора, пригодного для клонирования и экспрессии продуктов в клетках грамположительных бактерий. В качестве такого промотора был выбран гибридный *spac*-промотор, сконструированный путем слияния операторного участка *lac*-оперона грамотрицательных бактерий и промотора одного из бактериофагов *B. subtilis*, и обеспечивающий высокий уровень транскрипции генетического материала в клетках бактерий *B. subtilis* [8]. При наличии в клетке продукта гена *lacI*, белка-регулятора LacI, индукция данного промотора осуществляется посредством добавления в среду культивирования клеток индуктора IPTG.

Для помещения клонированного гена под контроль *spac*-промотора использовали вектор pMTL21CspII. Плазмида pMTL21CspII содержит *Col* E1-репликон, детерминанты антибиотикорезистентности к ампициллину и хлорамфениколу, способный экспрессироваться в клетках *B. subtilis*, а также *spac*-промотор [14]. Наличие *Col* E1-репликона обеспечивает наследование данного вектора в клетках *E. coli*. Участок, содержащий *spac*-промотор и маркер антибиотикорезистентности к хлорамфениколу, вырезали из pMTL21CspII по сайтам действия рестриктазы *Eco*RI и ввели в состав pBR2a по сайтам действия этой же рестриктазы. В результате клонирования была получена рекомбинантная плазмида pBR2asp. Полная схема конструирования pBR2asp представлена на рисунке 3. Полученная плазмида способна наследоваться в клетках *E. coli*, содержит ген биотинового оперона *M. flagellatum bioA* под контролем *spac*-промотора, а также маркер антибиотикорезистентности к хлорамфениколу, способный экспрессироваться в клетках *B. subtilis*. Плазмида pBR2asp не способна к репликации в клетках грамположительных бактерий и является для них вектором интеграции.

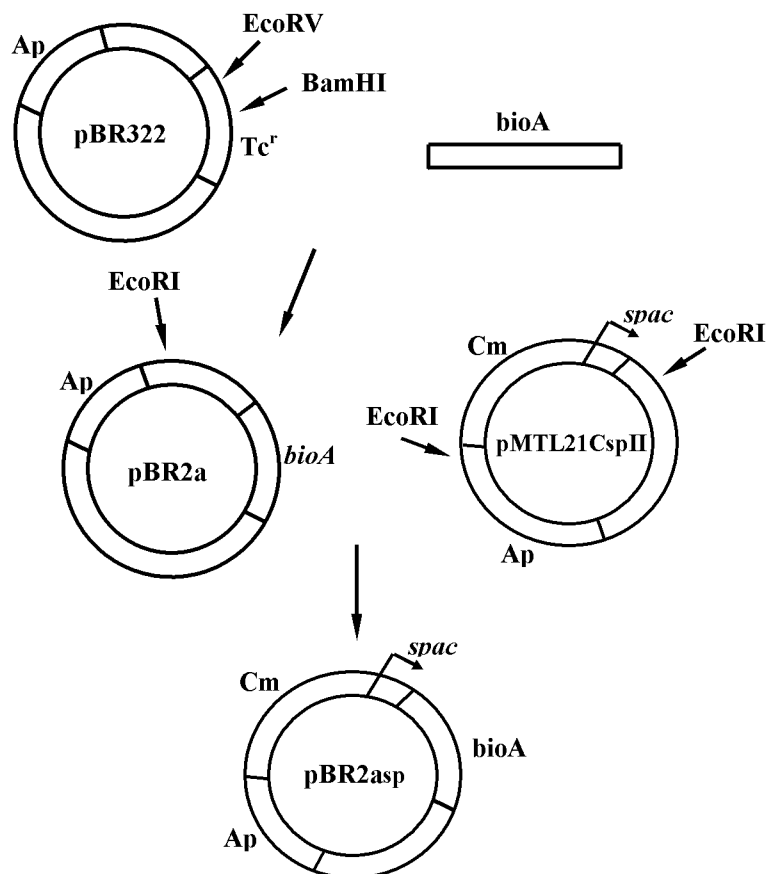


Рисунок 3 – Схема конструирования рекомбинантной плазмиды pBR2asp

Функциональная активность клонированного гена *bioA* проверялась посредством проведения комплементационного теста. Для этого биотинзависимый штамм *E. coli* K-12 R879 (*bioA*⁻) трансформировали вектором pBR2asp. После чего проверяли способность трансформантов расти на минимальной глюкозо-солевой среде без биотина. Результаты комплементационного теста подтвердили функциональную активность клонированного гена.

Как отмечалось, ранее плазида pBR2asp не способна к репликации в клетках грамположительных бактерий и является для них вектором интеграции. На следующем этапе работы осуществляли введение плазмиды pBR2asp в клетки бактерий *B. subtilis*. В качестве хозяина использовали штамм *B. subtilis* 4WN5. В хромосому данного штамма интегрирована последовательность плазмиды p4WN5. При трансформации и введении в клетки штамма *B. subtilis* 4WN5 рекомбинантной плазмиды pBR2asp, последовательность ДНК плазмиды способна интегрировать в состав хромосомы за счет гомологичной рекомбинации между последовательностью ДНК pBR2asp и гомологичной ей областью в составе плазмиды p4WN5, интегрированной в хромосому. В ходе работы после трансформации был отобран ряд клонов, образованных клетками *B. subtilis* 4WN5, устойчивыми к хлорамфениколу. Такая устойчивость могла возникнуть вследствие интеграции плазмидной ДНК pBR2asp в хромосому бактерий. Действительно, результаты полимеразной цепной реакции, проведенной с использованием праймеров bioA1 и bioA2 для амплификации гена *bioA* свидетельствуют об интеграции гена *bioA* *M. flagellatum* под контролем *spac*-промотора в хромосому *B. subtilis* 4WN5. Полученный штамм с интегрированным в хромосому геном *bioA* *M. flagellatum* был обозначен как *B. subtilis* 4WN5A.

Таким образом, в результате работы был создан вектор интеграции pBR2asp, содержащий ген *bioA* *M. flagellatum* под контролем *spac*-промотора. С помощью данного вектора получен рекомбинантный штамм *B. subtilis* 4WN5A с интегрированным в хромосому геном биотинового оперона *bioA* *M. flagellatum*.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований.

Список литературы

1. Воробьева, Л.И. Микробиологический синтез витаминов / Л.И. Воробьева. – М.: Изд-во МГУ, 1982. – 168с.
2. 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.
3. Серебрянский, И.Г. Генетическое изучение биосинтеза биотина у облигатного метилотрофа *Methylobacillus flagellatum*: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 08.00.15 / И.Г. Серебрянский. – М., 1998. – 21с.
4. Cloning, sequenseng, and characterization of the *Bacillus subtilis* biotin biosynthetic operon / S. Bower [et al.] // J. Bacteriol. – 1996. – Vol. 178. – P. 4122–4130.
5. Cloning and characterization of the *Bacillus subtilis* *birA* gene encoding a repressor of the biotin operon / S. Bower [et al.] // Bacteriol. – 1995. – Vol. 177. – P. 2572–2575.
6. Restoration of Growth Phenotypes of *Escherichia coli* DH5 α in Minimal Media through Reversal of a Point Mutation in *purB* / S.-C. Jung [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2010. – Vol. 76, № 18. – P. 6307–6309.
7. Чеписюк, Н.В. Замена природного промотора биотинового оперона бактерий *Bacillus subtilis* 168t на *spac*-промотор / Н.В. Чеписюк, В.А. Прокулевич // Труды БГУ. – 2009. – Т. 3, №2 – С. 158–163.
8. Barker, D.F. Use of bio-lac fusion strains to study regulation of biotin biosynthesis in *Escherichia coli* / D.F. Barker, A.M. Campbell // J. Bacteriol. – 1980. – Vol. 143. – P. 789–800.
9. Васин, В.М. Регуляция экспрессии генов биосинтеза биотина в *Methylobacillus flagellatum* : дис. ... канд.биол.наук: 03.00.15 / В.М. Васин. – М., 1998. – 85с.
10. Чеписюк, Н.В. Создание векторов интеграции для использования в клетках *Bacillus subtilis* / Н.В. Чеписюк, В.А. Прокулевич // Материалы конференции, посвященной 45-летию основания Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси. – 2010. – С. 122.
11. Watson, N.A New revision of the sequence of plasmid pBR322 / N.A. Watson // Gene. – 1988. – Vol. 70. – P. 399–403.
12. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
13. Bron, S. Plasmids / - Molecular Biological Methods for *Bacillus*. Ed. Harwood C.R. - John Wiley and Sons Ltd, Chichester. – 1990. – P. 75–174.
14. 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.

CLONING OF METHYLOBACILLUS FLAGELLATUM BIOA GENE IN THE CELLS OF BACILLUS SUBTILIS

N.V. Chepisiuk, V.A. Prokulevich
Belarusian State University, Minsk, Belarus

A new integrational vector pBR2asp, containing biotin biosynthesis gene *bioA* of *M. flagellatum* was constructed. *BioA* was placed under the control of *spac*-promoter. The integrational vector pBR2asp was used for the construction of recombinant strain *B. subtilis*4WN5A. *B. subtilis*4WN5A contains *M. flagellatum bioA* integrated into the chromosome.