

У мутанта Т4 инсерция транспозона произошла в хромосомный ген SMc02421, кодирующий фермент N-этиламмелин хлоргидролазу, который принимает участие в деградации хлор-содержащих гербицидов.

У мутанта Т795 инсерция транспозона выявлена в гене *thiC* (SMb20615), расположенном на мегаплазмиде-2 и принимающем участие в биосинтезе тиамин.

Ранее у штаммов СХМ1-105 и СХМ1-188 *S.meliloti* были идентифицированы *eff*-гены, контролирующие транспорт в клетку сахаров, синтез аденилатциклазы и деполимеризацию экзополисахарида-1 [3, 4]. В нашей работе было выявлено три новых гена, предположительно участвующих в контроле СЭ клубеньковых бактерий люцерны. Мутации в этих генах оказывают на бактерии плейотропный эффект, затрагивая не только СЭ, но и некоторые культурально-биохимические признаки, которые могут быть использованы в качестве маркеров *eff*-генов при генетическом анализе СЭ. Полученные результаты существенно расширяют наши знания о системе негативного контроля СЭ со стороны клубеньковых бактерий. Дальнейшее изучение этой системы позволит перейти к направленному конструированию хозяйственно-ценных штаммов этих бактерий.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 08-04-01230-а.

1. L.A. Sharypova, O.P. Onischchuk, O.N. Chesnokova, et al.. Isolation and characterization of *Rhizobium meliloti* Tn5 mutants showing enhanced symbiotic effectiveness // *Microbiology*. - 1994. - V.140 - P.463-470.
2. О.П.Онищук, О.Н.Курчак, Л.А.Шарыпова и др. Анализ различных типов конкурентоспособности у Tn-5 мутантов клубеньковых бактерий люцерны (*Sinorhizobium meliloti*) // *Генетика*. -2001. - Т.37. - № 9. - С.1-6.
3. L.A. Sharypova, B.V. Simarov. Identification of genes affecting symbiotic effectiveness of *Rhizobium meliloti* // *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*.- Ed. Tikhonovich I.A. et al.- 1995. -Kluwer Acad. Publ. -P. 371-376.
4. L.A. Sharypova, et al. The *eff*-482 locus of *Sinorhizobium meliloti* CXM1-105 that influences symbiotic effectiveness consists of three genes encoding an endoglucanase, a transcriptional regulator and an adenylate cyclase // *Molec. Gen. Genet.* -1998.- V. 261.- P. 1032-1044.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КУРИНОГО И СВИНОГО ЛЕЙКОЦИТАРНОГО α -ИНТЕРФЕРОНА В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

М.И. Потапович, М.В. Трубицына, В.А. Прокулевич

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

potapovich@bsu.by

Интерфероны (ИФНы) - это большое семейство гликопротеинов, обладающих антивирусной активностью, участвующих в активации иммунной системы организма, а также в регуляции деления клеток.

Существует три основных типа интерферонов: I тип представляет собой гетерогенную группу белков, включающую ИФН-альфа (α), -бета (β), -дельта (δ), -эпсилон (ϵ), -каппа (κ), -омега (ω), -тау (τ), -зета (ζ) и др., ко II типу относится ИФН-гамма (γ). Группу интерферонов III типа образуют ИФН-лямбда1 (λ), - λ 2 и - λ 3 [1, 2]. У курицы домашней (*Gallus gallus*) идентифицировано по меньшей мере 10 генов, кодирующих α -интерфероны. Все эти гены лишены интронов и расположены на коротком плече Z-хромосомы [3]. У свиньи домашней (*Sus scrofa*) обнаружено 14 генов α -интерферонов и два псевдогена, которые расположены на первой хромосоме и тоже не имеют интронов [4].

В связи с распространением ряда высокоопасных заболеваний вирусной этиологии, таких как птичий грипп, африканская чума свиней и др., возрос интерес к лекарственным препаратам для лечения и профилактики болезней подобного рода у животных. Получение куриного и свиного лейкоцитарного α -интерферона в клетках прокариот может стать основой для создания новых лечебно-профилактических препаратов для животноводства.

Для амплификации генов куриного и свиного лейкоцитарного α -интерферона с помощью ПЦР на матрице тотальной ДНК, выделенной из крови соответствующих животных, на основе имеющихся в базе данных GenBank нуклеотидных последовательностей сконструированы пары специфических праймеров F1-R1 и Fp-1-Rp-1, соответственно. Продукты амплификации ДНК встроили в плазмиду pUC18, после чего нуклеотидные последовательности генов куриного и свиного α -интерферона определили путем секвенирования по методу Сэнгера на секвенаторе ALFexpress II.

На следующем этапе гены куриного и свиного лейкоцитарного α -интерферона перенесли в вектор экспрессии pET24b(+) по сайтам рестриктаз *Nde* I-*Eco* RI. Полученными рекомбинантными плазмидами, названными соответственно pMP1 и pIP2403, трансформировали штамм *E. coli* BL21 (λ DE3), который является лизогенным по бактериофагу λ DE3, содержащему ген РНК-полимеразы бактериофага Т7 под контролем P_{lacUV5} -промотора. Клетки *E. coli* BL21 (λ DE3), наследующие указанные плазмиды, выращивали в присутствии ИПТГ (изопропил- β -D-тиогактопиранозид) для индукции экспрессии генов куриного и свиного лейкоцитарного α -интерферона (рисунок 1).

Рис. 1. SDS-ПААГ-электрофореграмма клеточных белков бактерий *E. coli* BL21 (λ DE3) pMP1 и *E. coli* BL21 (λ DE3) pIP2403.

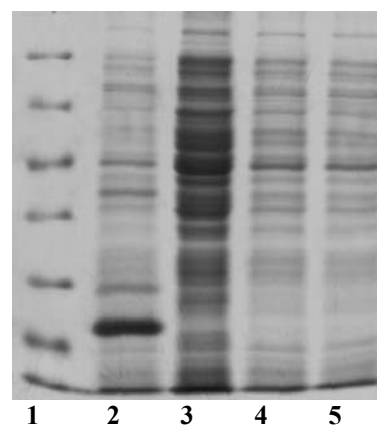
№1 – белки-стандарты молекулярной массы (сверху вниз – 116 кДа, 66 кДа, 45 кДа, 35 кДа, 25 кДа, 18,4 кДа, 14,4 кДа) (Fermentas SM0431).

№2 – клеточные белки бактерий *E. coli* BL21 (λ DE3) pMP1 через 4 часа после индукции ИПТГ в концентрации 0,5 мМоль/л.

№3 – клеточные белки бактерий *E. coli* BL21 (λ DE3) pIP2403 через 4 часа после индукции ИПТГ в концентрации 0,5 мМоль/л.

№4 – клеточные белки бактерий *E. coli* BL21 (λ DE3) pMP1 без индукции ИПТГ.

№5 – клеточные белки бактерий *E. coli* BL21 (λ DE3) pIP2403 без индукции ИПТГ.



Полученные результаты свидетельствуют о том, что после индукции ИПТГ в бактериальных клетках, содержащих рекомбинантную плазмиду с геном куриного лейкоцитарного α -интерферона, наблюдается накопление белка, соответствующего по молекулярной массе куриному α -интерферону (около 19 кДа). В то же время в клетках *E. coli*, содержащих плазмиду с геном свиного лейкоцитарного α -интерферона, накопление соответствующего белкового продукта (около 19 кДа) не происходит.

Из литературных данных [5] известно, что различие в частоте встречаемости синонимических аминокислотных кодонов в клетках про- и эукариот может являться одной из причин отсутствия или недостаточно высокого уровня экспрессии гетерологичных генов в бактериальных клетках. Проведенный анализ показал, что в структурной части гена куриного лейкоцитарного α -интерферона имеется шесть, а в составе свиного – девятнадцать редко встречающихся в *E. coli* аминокислотных кодонов.

Для оценки влияния на экспрессию гетерологичных генов различий в частоте встречаемости синонимических аминокислотных кодонов в клетках про- и эукариот, была проведена трансформация штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, содержащего амплифицированные копии генов редких т-РНК, плазмидами pMP1 и pIP2403.

Результаты показали, что после индукции в клетках штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL происходит значительное накопление белка, соответствующего по размеру свиному лейкоцитарному α -интерферону. Кроме того, образование существенно большего количества белка, соответствующего по размеру куриному лейкоцитарному α -интерферону, происходит в клетках штамма, содержащего амплифицированные копии генов редких т-РНК (рисунок 2 А, Б).

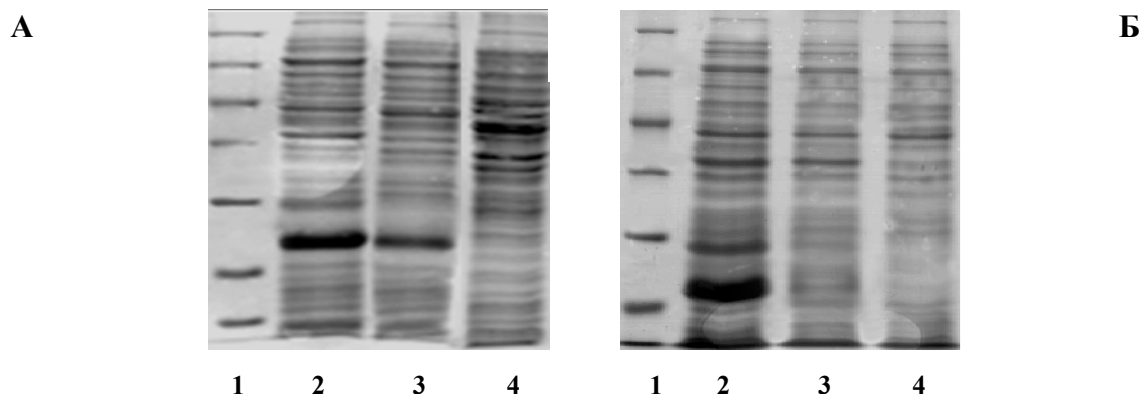


Рис. 2. А) SDS-ПААГ-электрофореграмма клеточных белков бактерий *E. coli* BL21 (λDE3) pMP1 и *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL pMP1.

№1 – белки-стандарты молекулярной массы (сверху вниз – 116 кДа, 66 кДа, 45 кДа, 35 кДа, 25 кДа, 18,4 кДа, 14,4 кДа) (Fermentas SM0431); №2 - клеточные белки бактерий *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL pMP1 через 4 часа после индукции ИПТГ в концентрации 0,5 мМоль/л.; №3 - клеточные белки бактерий *E. coli* BL21 (λDE3) pMP1 через 4 часа после индукции ИПТГ в концентрации 0,5 мМоль/л.; №4 - клеточные белки бактерий *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL pMP1 без индукции ИПТГ.

Б) SDS-ПААГ-электрофореграмма клеточных белков бактерий *E. coli* BL21 (λDE3) pIP2403 и *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL pIP2403.

№1 – белки-стандарты молекулярной массы (сверху вниз – 116 кДа, 66 кДа, 45 кДа, 35 кДа, 25 кДа, 18,4 кДа, 14,4 кДа) (Fermentas SM0431). ; №2 - клеточные белки бактерий *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL pIP2403 через 4 часа после индукции ИПТГ в концентрации 0,5 мМоль/л.; №3 - клеточные белки бактерий *E. coli* BL21 (λDE3) pIP2403 через 4 часа после индукции ИПТГ в концентрации 0,5 мМоль/л. ; №4 - клеточные белки бактерий *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL pIP2403 без индукции ИПТГ.

Таким образом, можно сделать вывод, что различия в частоте встречаемости синонимических аминокислотных кодонов у *E. coli*, *G. gallus* и *S. scrofa* оказывают решающее влияние на накопление в бактериальных клетках куриного и свиного лейкоцитарного α-интерферона.

1. Meager A. Biological assays for interferons // J. Immunol. Methods. – 2002. – V. 261. – P.21-36.
2. Randall R. E., Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures // Journal of General Virology. – 2008. – V. 89. – P.1-47.
3. Schultz U., Kaspers B., Staeheli P. The interferon system of non-mammalian vertebrates // Develop. Comparat. Immunol. – 2004. – V. 28. – P.499-508.
4. Cheng G., Chen W., Li Z., Yan W., Zhao X., Xie J., Liu M., Zhang H., Zhong Y., Zheng Z. Characterization of the porcine alpha interferon multigene family // Gene. – 2006. – V. 382. – P.28-38.
5. Guarente L., Roberts T. M., Ptashne M. A technique for expressing eukaryotic genes in bacteria // Science. – 1980. – V. 209. – P.1428-1430.

ГЕН Sma1514 ВОВЛЕЧЕН В ФОРМИРОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОГО СИМБИОЗА *SINORHIZOBIUM MELILOTI* С ЛЮЦЕРНОЙ

Т.Б. Румянцева, С.Н. Юргель, Л.А. Шарыпова, Т.В. Затовская, Б.В. Симаров

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии

РАСХН, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

genet@yandex.ru

У клубеньковых бактерий *Sinorhizobium meliloti*, вступающих в симбиоз с люцерной, донником и пажитником, геном состоит из хромосомы и двух мегаплазмид pSyma и pSymb. Известно, что большинство генов, необходимых для формирования и функционирования симбиоза расположены на мегаплазмиде pSyma (*nod*, *nif*, *fix* гены). В настоящее время геном модельного штамма 1021 *Sinorhizobium meliloti* полностью секвенирован. Было показано,