

Анализировался качественный белковый состав экстракта до и после упаривания. Электрофореграмма для упаренного экстракта показала наличие большего количества белковых фракций, чем для неупаренного. Возможно, это связано с увеличением концентрации белка в процессе упаривания, хотя не исключается и термическое воздействие во время получения препарата. На всех электрофореграммах присутствуют пять четко проявляющихся белковых фракции. Относительные величины их пробега в среднем равны $rf_1=0,14$; $rf_2=0,27$; $rf_3=0,56$; $rf_4=0,85$ и $rf_5=1$.

Предварительный анализ гелевых столбиков, содержавших более концентрированный упаренный экстракт, выявил участок, изменявший рН в присутствии 0,1М раствора мочевины сильнее, чем другие участки геля. При сравнении расположения этого участка с проявленной амидо черным электрофореграммой, удалось отождествить его с полосой белка, относительный пробег которого равен $rf=0,8$. Таким образом, можно предположить, что эта полоса соответствует белковой фракции, содержащей уреазу. Следует отметить, что использованная нами методика оценки ферментативной активности компонентов электрофореграммы достаточно грубая и позволяет выявить лишь компоненты, обладающие высокой ферментативной активностью. Не исключено, что уреазной активностью кроме белка с $rf=0,8$ обладают и другие компоненты экстракта. В литературе имеются сведения, что уреазы из семян сои представлена в основном в виде тетрамера, а в листьях – в виде димера. Вполне вероятно, что в процессе экстрагирования и последующего упаривания в препарате уреазы могут появиться несколько форм фермента.

В дальнейшем в ходе детального изучения свойств отдельных белков будут уточнены локализация и кинетические параметры уреазы.

Литература

1. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. М., 1979.
2. Паспорт прибора для электрофореза «ПЭФА-1». 1987, 38с.
3. Филиппович Ю., Егорова Т, Севастьянова Г. Практикум по общей биохимии. М., 1975.
4. С. Hirayama, M. Sugimura, H. Saito, M. Nakamura // *Phytochemistry*. V. 53. 2000. p. 325–330.

КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* – ПРОДУЦЕНТОВ В-КАРОТИНА

Ю. В. Барай, Д. В. Галиновский

Каротиноиды представляют собой структурно разнообразный класс природных пигментов, выполняющих важные биологические функции, как в растительных, так и в животных клетках [1]. В последнее время ка-

ротиноиды все более широко применяются в пищевой, косметической и фармацевтической промышленности, что требует создания наиболее перспективных штаммов-продуцентов этих соединений [2]. Для решения данной проблемы можно использовать клонирование и экспрессию генов, ответственных за процесс биосинтеза каротиноидов, в различные подходящие для этого микроорганизмы. При этом поиск эффективного вектора представляется весьма актуальной задачей. Известно, что во многих случаях на уровень биосинтеза целевого продукта клетками микроорганизмов, трансформированными соответствующими плазмидами, существенно влияет копияность последних. Так, с одной стороны, было показано, что увеличение копияности плазмиды, несущей гены биосинтеза β -каротина, приводило к увеличению продукции этого пигмента, как в бактериях *E. coli*, так и в *Agrobacterium tumefaciens* [3]. С другой стороны, оказалось, что наилучшая продукция β -каротина в бактериях *E. coli*, обнаруживалась при использовании низкокопийного вектора [4]. Также было показано, что при экспрессии низкокопийной плазмиды в бактериях *E. coli*, продукция ликопина повышалась на 23% по сравнению с *E. coli*, несущими высококопийную плазмиду [5]. В связи с этим, настоящая работа посвящена установлению зависимости между уровнем продукции β -каротина штаммами *E. coli* и копияностью плазмиды, несущей гены *crt* – кластера бактерий *P. agglomerans* 206.

Материалы и методы

В работе использовали плазмиду pUC18-1-31ee, сконструированную на основе вектора pUC18 и несущую гены каротиногенеза бактерий *P. agglomerans* 206. Данная плазида обеспечивает синтез каротиноидов бактериями *E. coli* (фенотипическое проявление – желтая окраска колоний). Перенос клонированного фрагмента *crt*-кластера в плазмидные вектора разной копияности (см. таблицу 1) проводили стандартным методом [6]. Плазмиду pUC18-1-31ee обрабатывали ферментом EcoRI с последующим рестрикционным анализом. После чего фрагмент, несущий *crt*-гены, выделяли из геля с использованием колонок GFX PCR DNA and Gel Band purification Kit (Amersham Biosciences). Затем указанный фрагмент лигировали, используя фермент T4 ДНК лигазу, с предварительно выделенными и подвергнутыми действию фермента EcoRI векторами pZH448, pZH449 и pBR322, pHRP308. Полученные конструкции вводили в штаммы *E. coli* DH5 α и *E. coli* XL1-blue путем трансформации. Отбор трансформантов осуществлялся на агаризованной LB-среде с соответствующим антибиотиком (таблица 1).

Таблица 1

Вектора, используемые в работе и их копияности

Плазмида-вектор	Репликон	Антибиотик, использованный в качестве селективирующего фактора	Копийность, копий/кл
pHRP308	pSF1010	гентамицин	1-3 [7]
pZH448	p15A	гентамицин	15-17 [8]
pZH449	p15A	гентамицин	15-17 [8]
pBR322	pMB1	ампициллин	20-25 [7]
pUC18	pMB1	ампициллин	около 300 [7]

Выделение плазмидной ДНК, рестрикцию ДНК, лигирование фрагментов ДНК, электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле, трансформацию бактерий проводили по методикам, описанным в руководстве Маниатис Т. и соавт. (1984) [6].

Для количественного определения каротиноидов штаммы *E. coli*, содержащие плазмиды каротиногенности, выращивали в LB бульоне, содержащем антибиотик, детерминанту устойчивости к которому несла соответствующая плазмида (таблица 1). Экстракцию пигментов из клеток, полученных центрифугированием, проводили смесью метанол-хлороформ (2:1) в течение 40-60 минут [9]. После чего измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 461 нм. Параллельно с выделением каротиноидов проводили определение белка по методу Брэдфорда [10], пробы на который предварительно отбирали из той же культуральной жидкости. Продукцию каротиноидов выражали в количестве мкг пигментов на 1 мг общего клеточного белка. Для каждого штамма проводили не менее трех измерений, полученные данные подвергали статистической обработке по Рокицкий П.Ф. (1973) [11].

Результаты и их обсуждение

Crt-кластер штамма *P. agglomerans* 206 состоит из 6 генов (таблица 2 и рисунок 1), организованных в два оперона [1]. Конечным продуктом в указанном штамме является зеаксантин- β -D-диглюкозид [12].

Таблица 2

Гены crt-кластера *P. agglomerans* и их продукты

Ген	Фермент
<i>crtE</i>	геранилгеранилпирофосфат синтаза
<i>crtB</i>	фитоинсинтаза
<i>crtI</i>	фитоиндегидрогеназа
<i>crtY</i>	ликопинциклаза
<i>crtZ</i>	β -каротингидроксилаза
<i>crtX</i>	зеаксантингликозилаза

Поскольку, для нас желаемым конечным продуктом являлся β -каротин, в данной работе мы использовали *crt*-кластер, лишенный гена *crtZ*. В результате трансформации бактерий *E. coli* DH5 α и *E. coli* XL1-blue химерными плазмидами, содержащими фрагмент *crt*-кластера бактерий *P. agglomerans* 206, были получены штаммы (см. таблицу 3), которые формировали на агаризованной LB-среде колонии желтого цвета. Результаты измерения уровня синтеза каротиноидных пигментов у указанных штаммов представлены на рисунке 2.



Рис.1 Организация генов биосинтеза каротиноидов у *P. agglomerans* 206. Показано направление транскрипции генов.

Таблица 3

Штаммы *E. coli*, использованные в данной работе

Штаммы <i>E. coli</i>	Плазмида-вектор
XL-1-blue pJul448; DH5 α pJul448	pZH448
XL-1-blue pJul449; DH5 α pJul449	pZH449
XL1-blue pBR322-1-31ee; DH5 α pBR322-1-31ee	pBR322
XL1-blue pHRP308-1-31ee; DH5 α pHRP308-1-31ee	pHRP308
XL1-blue 1-31ee; DH5 α 1-31ee	pUC18

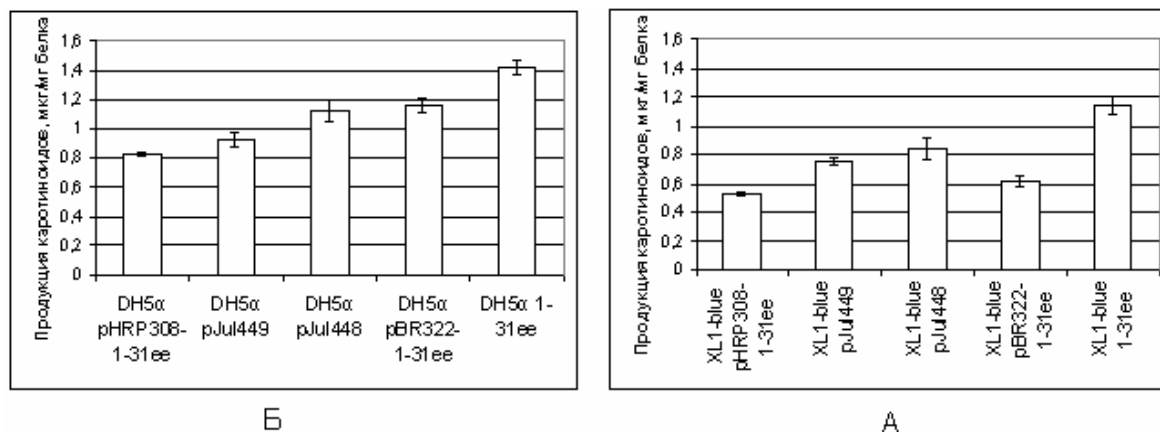


Рис.2 Уровень синтеза каротиноидных пигментов штаммами *E. coli* DH5 α - А и *E. coli* XL1-blue - Б.

Как видно из представленных диаграмм для штаммов *E. coli* DH5 α прослеживается четкая динамика зависимости продукции каротиноидов от копияности каротиногенной плазмиды. Для штаммов *E. coli* XL1-blue также можно отметить имеющуюся динамику зависимости, хотя и не такую выраженную, как это показано для штаммов *E. coli* DH5 α .

Таким образом, можно сделать вывод о том, что, в целом, продукция каротиноидных пигментов изучаемыми штаммами *E. coli* зависит от копийности плазмиды, несущей гены *crt* – кластера бактерий *P. agglomerans* 206. Однако следует отметить, что при увеличении копийности плазмид в сотни раз, увеличение продуктивности штаммов происходит всего в 1,7-2,2 раза для *E. coli* DH5 α и *E. coli* XL1-blue, соответственно. По-видимому, такую слабую зависимость между продукцией β -каротина и копийностью каротиногенной плазмиды можно объяснить наличием у бактерий *E. coli* лимитирующих факторов – ограниченное количество предшественников изопреноидов, невозможность накопления большого количества каротиноидов в мембранах клетки.

Дополнительно было установлено, что в среднем продукция каротиноидных пигментов штаммами *E. coli* DH5 α в 1,5 раза превышает продукцию штаммами *E. coli* XL1-blue. Основываясь на полученных результатах, необходимо провести дальнейшие исследования с целью изучения экспрессии *crt*-генов в различных штаммах-хозяевах грамотрицательных бактерий, что позволит использовать полученные данные для конструирования высокоэффективных штаммов-продуцентов этих веществ.

Выражаем искреннюю благодарность за ценные замечания и предложения в ходе выполнения экспериментов и написания статьи д. б. н., профессору Евтушенкову А.Н., а также Ph. D. Николайчику Е.А., доценту кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ и Ph. D Seiichi Yasuda from Department of Microbial Genetics National Institute of Genetics за любезно предоставленные плазмидные вектора, использованные в работе.

Литература

1. *Armstrong G.A. // J. Microbiology. – 1997. – 51:629-59. – pp. 629-659.*
2. *Селезнёва Ю.В. Генетический контроль синтеза каротиноидных пигментов у бактерий *Pantoea agglomerans*: Дис. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук: 03.00.26. / Мн., 2006. – 114 с.*
3. *Tao L., Jackson R.E., Cheng Q. // Metab. Eng. – 2005. – 7(1) – pp. 10–17.*
4. *Kim S.W., Kim J.B., Jung W.H., Kim J.H., Jung J.K. // AceBiotech Co Ltd. – 2006. – 28(12) – pp. 897–904.*
5. *Jones K.L., Kim S.W., Keasling J.D. // Metab. Eng. – 2000. – 2(4) – pp. 328-338.*
6. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование, М: Мир, 1984, с. 477.*
7. *Catalog of the cloning vector collection. / Department of microbial genetics, National institute of genetics; Compiled and edited by Yasuda S. with the assistance of Tamura S. and Yamamoto M. – Mishima, 2006. – 120 p.*
8. *Quandt J. and F. Hynes M. // Gene. – 1993. - № 127. – pp. 15-21.*
9. *Hundle B.S., Beyer P., Kleinig H., Englert G., Hearst J.E. // Photochemistry and photobiology. – 1991. – Vol. 54, №1. – pp. 89-93.*

10. Досон Р., Элиот Д., Элиот У., Джонс К. Справочник биохимика, М: Мир, 1991, с. 466–477.
11. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика, Минск: Высшая школа, 1973, с. 80–83.
12. Hundle B. S., O'Brien D. A., Alberti M., Beyer P., Hearst J. E. // Biochemistry. – 1992. – Vol. 89. – pp. 9321–9325.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГНИЛЕЙ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ХРАНЕНИИ

Е. И. Карпович, А. В. Богачева

В настоящее время существует опасность широкого распространения возбудителя бурой бактериальной гнили. С 1997 г. *Ralstonia solanacearum* занесена в список карантинных объектов стран-участниц СНГ и стран Балтии. Имеются сообщения о выделении этих бактерий на граничащих с Беларусью территориях (Иванюк и др., 2003). Это позволяет ожидать распространений этого патогена на территории нашей республики.

Основной целью нашей работы являлось выделение и идентификация фитопатогенных бактерий с помощью физиолого-биохимических тестов и молекулярно-биологических методов; обнаружение, выделение чистой культуры возбудителя бурой бактериальной гнили клубней картофеля *Ralstonia solanacearum*, а также описание морфологических, физиолого-биохимических и биологических свойств данного патогена.

Исследование проводилось на 13 образцах картофеля различных сортов (Явор, Скарб, Аксамит, Лазурит, Альтаир, Сантэ), имеющих характерные для бурой гнили симптомы поражения клубней, находящихся на хранении. Из них были выделены чистые культуры 103 штаммов микроорганизмов.

Первоначальная диагностика изолированных бактерий заключалась в изучении морфологии, грампринадлежности и подвижности клеток. В итоге для дальнейшего исследования было оставлено 24 штамма, которые морфологически наиболее сходны с коллекционными штаммами *Ralstonia solanacearum*: грамтрицательные мелкие, короткие, толстые, подвижные палочковидные бактерии.

По основным физиолого-биохимическим тестам часть выделенных штаммов совпадают с использованными в исследованиях коллекционными штаммами *Ralstonia solanacearum*, однако наблюдаются различия по ряду признаков как с типовыми штаммами бактерий, так и исследуемых штаммов между собой. По результатам физиолого-биохимических тестов штаммы были поделены на группы (Таблица 1).