

УДК 577.21

Н.В. ЧЕПИСЮК, В.А. ПРОКУЛЕВИЧ

НАПРАВЛЕННЫЙ ИНСЕРЦИОННЫЙ МУТАГЕНЕЗ СТРУКТУРНЫХ ГЕНОВ БИОТИНОВОГО ОПЕРОНА У БАКТЕРИЙ ВИДА *BACILLUS SUBTILIS*

We have constructed two kinds of vectors for the rapid inactivation of chromosomal genes of the biotin operon in the cells of *Bacillus subtilis*, by means of insertional mutagenesis through double crossing over and integration into the chromosome by Campbell-type recombination. The above-mentioned hybrid plasmids containing mutations in the genes *bioF* and *bioB* were first constructed in *E. coli* and then used for the inactivation of these genes in the cells of *B. subtilis*.

Биотин (витамин Н) обладает высокой физиологической активностью. Являясь кофактором ферментов, осуществляющих реакции карбоксилирования и транскарбоксилирования, он участвует во многих обменных процессах [1]. Широкое применение биотина в косметической и пищевой промышленности, сельском хозяйстве и медицине обуславливает необходимость его крупномасштабного производства с помощью биотехнологических методов, что подразумевает создание штаммов, характеризующихся повышенной продукцией данного соединения. Одними из возможных перспективных продуцентов биотина являются бактерии вида *B. subtilis*. Повышение продукции определенного соединения (метаболита) в клетках того или иного микроорганизма может осуществляться с помощью различных биотехнологических приемов: увеличение числа копий генетических детерминант, ответственных за биосинтез данного соединения, снятие негативной регуляции его биосинтеза, а также получение мутантов, устойчивых к аналогам продуктов биосинтетического пути [2]. Анализ осуществляемых модификаций предполагает использование мутантных по продукции данного соединения бактерий для определения уровня экспрессии генов биотинового оперона, введенных в клетки *B. subtilis* в составе векторов, а также для количественного определения биотина и его витаминерных синтезируемых клетками.

Целью данной работы являлась разработка систем направленного мутагенеза и получение мутантов по структурным генам биотинового оперона у бактерий вида *B. subtilis*.

Материал и методика

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

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 [6]. Трансформацию клеток *B. subtilis* проводили согласно рекомендациям, приведенным в работе [7].

Штаммы бактерий и плазмиды, использованные в работе

Объект	Описание	Источник/ссылка
<i>E. coli</i> XL1-Blue	F ⁺ proABlac ^r lacZΔM13Tn10(Tet ^r)/ recA1endA1gyrA96(Nal ^r)thi1R17 (r _{km⁺})supE44relA1lac	[3]
<i>B. subtilis</i> 168t	Прототроф, образовавшийся в результате трансформации бактерий <i>B. subtilis</i> 168 tr ⁺ тотальной ДНК бактерий <i>B. subtilis</i> дикого типа	Данная работа
pUC18	Ap ^r lacPOZ, ColE-репликон (2686 п. н.)	[4]
pMTL21C	LacZ Cm ^r Ap ^r , ColE-репликон (3543 п. н.)	[5]
pBioF	Ap ^r , в вектор pUC18 встроен ген <i>bioF</i>	Данная работа
pBioB	Ap ^r , в вектор pUC18 встроен ген <i>bioB</i>	Данная работа
pBioB1	Ap ^r Cm ^r pBioB, несущая 1010 п. н. SspI-фрагмент из pMTL21C	Данная работа
pBioF2	Cm ^r Ap ^r , pMTL21C, несущая 973 п. н. SspI-AsuII-фрагмент гена <i>bioF</i> , клонированный по SmaI	Данная работа

Тотальную ДНК исследуемых бактерий выделяли с помощью саркозилового метода, плазмидную ДНК – по стандартной методике щелочного лизиса [6].

Рестриктию плазмидной ДНК, обработку фрагментом Кленова и последующее легирирование фрагментов осуществляли в условиях, рекомендуемых фирмой-изготовителем «MBI Fermentas» (Литва), электрофоретический анализ ДНК – методами, приведенными в руководстве [6]. Агарозные гели готовили на основе TAE-буфера с бромистым этидием. Размер фрагментов ДНК устанавливали на основании их электрофоретической подвижности в агарозном геле.

Аmplification фрагментов ДНК проводили с использованием набора реактивов TaKaRa Ex TaqTM (Япония). Для амплификации фрагментов ДНК, соответствующих генам *bioB* и *bioF*, использовали две пары олигонуклеотидных праймеров: bioB1–bioB2 (для гена *bioB*) и bioF1–bioF2 (для гена *bioF*).

bioB1 5' – CGGGATCCAAGTGGGGTATGAGAATGA – 3'

bioB2 5' – CGGGATCCAGCTCGCAATGTCTCGTAAA – 3'

bioF1 5' – GGGGATCCGATGTGCAGCTCCTTTCCGATTGA – 3'

bioF2 5' – GGGGATCCGGTTACGAGCCTTGAAGATTCATT – 3'

Полимеразную цепную реакцию проводили при следующих параметрах: 94 °C – 5 мин (один цикл); 94 °C – 30 с, 53 °C – 30 с, 68 °C – 1 мин 30 с (30 циклов); 68 °C – 10 мин (один цикл). Праймеры содержали на 5'-концах сайты для рестриктазы *Bam*HI.

Для постановки секвенирующей реакции применяли набор CycleReaderTM Auto DNA Sequencing Kit производства «MBI Fermentas» (Литва). Нуклеотидные последовательности определяли с помощью автоматического секвенатора (ALFexpress II). Результаты анализировали с использованием компьютерных программ BLASTP2.2.1 и ALFwinTM Sequence Analyser (version 2.10).

Результаты и их обсуждение

Биотиновый оперон *B. subtilis* образован шестью структурными генами *bioWAFDBI*, локализованными в хромосоме в указанной последовательности (рис. 1) [8].



Рис. 1. Последовательность расположения генов биосинтеза биотина в хромосоме *Bacillus subtilis*

В качестве мишени для направленного мутагенеза методом вставок фрагментов ДНК были избраны два структурных гена: *bioF* и *bioB*. Ген *bioF* отвечает за синтез КАРА-синтетазы. Инсерция в область данного гена в силу полярного эффекта может привести к дополнительной инактивации еще трех генов – *bioD*, *bioB* и *bioI*. Ген *bioB*, детерминирующий биотинсинтетазу, расположен ближе к дистальному концу оперона, вследствие чего дополнительной инактивации может подвергнуться только один ген – *bioI* (см. рис. 1).

Для инактивации гена *bioB* использовали способ направленного мутагенеза, заключающийся в создании условий для рекомбинационной замены интактного хромосомного гена на *in vitro* модифицированный. Векторной молекулой служила плаزمида pUC18 Ap^r lacPOZ

(2686 п. н.). *Col* E1-репликон плазмиды позволяет ей нормально реплицироваться в клетках *E. coli*, но не в *B. subtilis*. Ген, обуславливающий резистентность к ампициллину, экспрессируется только в *E. coli*. Область *lacPOZ* содержит полилинкер с уникальным сайтом узнавания рестриктазой *Vam*HI. Аналогичные сайты были предусмотрены при конструировании праймерных ДНК для амплификации генов *bioB* и *bioF* бактерий *B. subtilis* 168t.

Направленное получение мутаций в области гена *bioF* производили с помощью вектора интеграции, в качестве которого использовали плазмиду pMTL21C (3543 п. н.). Данный вектор не способен к репликации в клетках *B. subtilis*, несет ген устойчивости к ампициллину, способный экспрессироваться в клетках *E. coli*, и ген устойчивости к хлорамфениколу, экспрессирующийся как в *E. coli*, так и в *B. subtilis*.

Фрагменты ДНК, содержащие гены биотинового оперона *bioF* и *bioB*, амплифицировали посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК хромосомы *B. subtilis* 168t с помощью праймеров *bioB*1, *bioB*2 и *bioF*1, *bioF*2. Размер продуктов амплификации для гена *bioB* составил 1185 п. н., а для *bioF* – 1193 п. н.

Амплифицированные фрагменты ввели в плазмидный вектор pUC18 по сайту узнавания рестриктазы *Vam*HI. Для этого провели рестрикцию и легирование ПЦР-продуктов генов *bioF*, *bioB* с вектором pUC18 с последующей трансформацией клеток *E. coli* XL1-Blue. Отбор клонов, образованных клетками, наследующими рекомбинантные плазмиды, осуществляли

на среде с ИПТГ и X-gal. В результате был отобран ряд трансформантов, предположительно содержащих рекомбинантные плазмиды с генами *bioF* и *bioB*, которые обозначены pBioV и pBioF.

Для доказательства наличия генов *bioB* и *bioF* в составе плазмид pBioV и pBioF определили нуклеотидные последовательности вставленных фрагментов ДНК. У плазмид pBioV и pBioF определена последовательность размером 644 и 602 нуклеотида соответственно. Сравнение нуклеотидных последовательностей с представленными в базах данных (GenBank (NCBI)) позволяет сделать заключение о том, что в плазмиде pBioV клонирован ген *bioB*, а в pBioF – ген *bioF* *B. subtilis* 168t.

Инактивацию *in vitro* гена *bioB* осуществляли с помощью детерминанты устойчивости к хлорамфениколу, источником которой являлась плаزمида pMTL21C. Ген антибиотикорезистентности вставляли в центральную область *bioB*, в которой находится уникальный сайт действия рестриктазы *Kpn*21. Так как в результате действия указанной рестриктазы образуются липкие концы, а вырезание фрагмента ДНК с детерминантой устойчивости к хлорамфениколу осуществляли по сайту действия рестриктазы *Ssp*I, приводящей к образованию тупых концов, реакции легирования предшествовало достраивание одноцепочечных 3'-концов. Сконструированными таким образом молекулами трансформировали клетки *E. coli* XL1-Blue. Отбор трансформантов проводили по признаку устойчивости к хлорамфениколу. Плазмиды, несущая инактивированный ген *bioB* бактерий *B. subtilis* со вставкой детерминанты устойчивости к антибиотику в центральной области, обозначена как pBioV1 (см. рис. 1). Эту плазмиду использовали для трансформации клеток штамма *B. subtilis* 168t. Селекцию трансформантов проводили по признаку устойчивости к хлорамфениколу. Поскольку плазмиды неспособны к репликации в бактериях *B. subtilis* 168t, то нечувствительные к хлорамфениколу клетки, возникающие в процессе трансформации, по-видимому, образуются за счет интеграции гена антибиотикорезистентности в хромосому. Наиболее вероятный путь такой интеграции – гомологичная рекомбинация по участкам ДНК, фланкирующим вставленный ген хлорамфениколарезистентности (рис. 2).

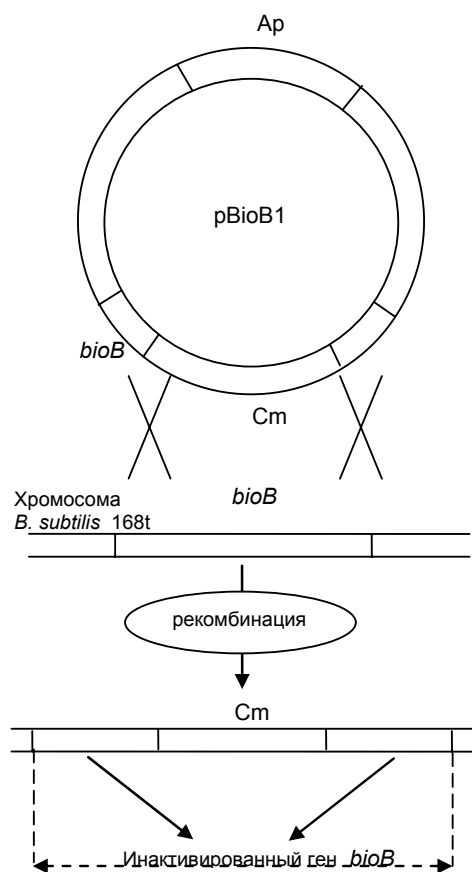


Рис. 2. Схема механизма рекомбинационной инактивации гена *bioB* с помощью плазмиды pBioV1

на среде с ИПТГ и X-gal. В результате был отобран ряд трансформантов, предположительно содержащих рекомбинантные плазмиды с генами *bioF* и *bioB*, которые обозначены pBioV и pBioF.

Направленный мутагенез гена *bioF* осуществляли путем рекомбинационной интеграции плазмиды pMTL21C в соответствующий сайт хромосомы *B. subtilis* 168t. В состав плазмиды pMTL21C ввели фрагмент гена *bioF*, что создало условия протекания гомологичной рекомбинации между плазмидой и хромосомой *B. subtilis* 168t. Укороченный фрагмент гена *bioF* размером 973 п. н. (обозначен как $\Delta bioF$) получили из плазмиды pBioF по сайтам действия рестриктаз *Asu*II и *Ssp*I. Далее $\Delta bioF$ вставили в вектор pMTL21C по сайту действия рестриктазы *Sma*I. Рекомбинантными молекулами трансформировали клетки *E. coli* XL1-Blue. Отбор трансформантов осуществляли на среде с ИПТГ и X-gal с добавлением ампициллина. Рестрикционный анализ выделенных плазмидных ДНК позволил отобрать бактерии *E. coli* XL1-Blue, несущие плазмиду pMTL21C с клонированным в них фрагментом гена *bioF*. Данную конструкцию обозначили pBioF2 и использовали для трансформации клеток штамма *B. subtilis* 168t. Селекцию проводили по признаку устойчивости к хлорамфениколу. Устойчивость клеток *B. subtilis* 168t к хлорамфениколу свидетельствует об интеграции маркера антибиотикорезистентности в хромосому и указывает на инактивацию хромосомального гена *bioF*, что фенотипически проявляется в ростовой зависимости от биотина. Механизм инактивации гена *bioF* представлен на рис. 3.

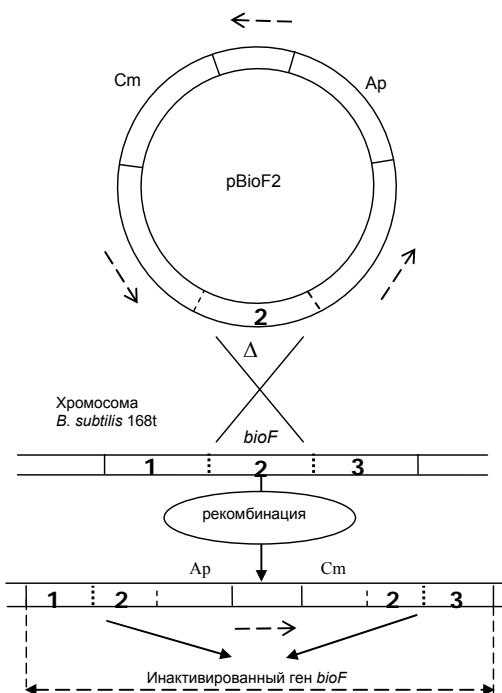


Рис. 3. Схема механизма инактивации гена *bioF* с помощью плазмиды pBioF2. 1, 2, 3 – ген *bioF*; $\Delta bioF$ – фрагмент гена *bioF* в составе плазмиды pBioF2. Направление интеграции плазмиды pBioF2 в хромосому показано стрелкой

Таким образом, получены рекомбинантные плазмиды pBioV1 и pBioF2, пригодные для направленного мутагенеза генов *bioB* и *bioF* за счет двойного и одиночного кроссинговера соответственно.

Доказательством инсерции кассеты антибиотикорезистентности в область гена *bioB* и интеграции pBioF2 в область гена *bioF* служат результаты ПЦР-анализа хромосомной ДНК трансформантов *B. subtilis* 168t. Электрофоретический анализ продуктов амплификации хромосомной ДНК мутантов *B. subtilis* 168t, зависимых по биотину, индуцированных плазмидой pBioV1, показал наличие фрагментов размером около 2200 п. н., что соответствует мутантному гену *bioB* со вставкой маркера антибиотикорезистентности, а также отсутствие фрагмента, соответствующего интактному гену *bioB* (см. рис. 3).

Результаты ПЦР-анализа образцов хромосомной ДНК, выделенной из Bio⁻-трансформантов *B. subtilis* 168t плазмидой pBioF2, свидетельствуют об отсутствии ПЦР-продукта, соответствующего интактному гену *bioF*, и наличии продукта амплификации, соответствующего вектору интеграции, встроившемуся в хромосому (рис. 4). Для контрольного препарата ДНК, в качестве которого выступала хромосомная ДНК исходного штамма *B. subtilis* 168t, характерно наличие фрагментов размером около 1185 п. н и 1193 п. н. (см. рис. 4) (интактные гены *bioB* и *bioF*).

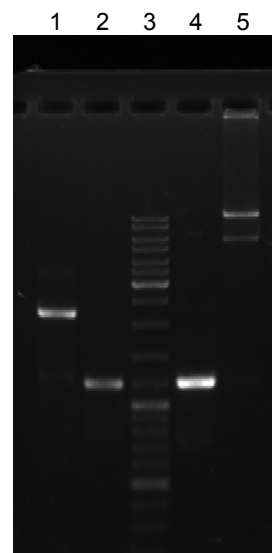


Рис. 4. Электрофоретическая подвижность амплифицированных фрагментов ДНК бактерий *B. subtilis* 168t для генов *bioB* и *bioF*.

Дорожки 1, 5 – бактерии *B. subtilis* 168t, трансформированные плазмидой pBioV1 и pBioF2 соответственно; 3 – подвижность ДНК-маркера (GeneRuler™ DNA Ladder Mix); 2, 4 – препараты хромосомальной ДНК интактных клеток *B. subtilis* 168t

Таким образом, на основе широко распространенных векторов грамотрицательных бактерий *E. coli* – плазмид рUC18 и рMTL21С путем введения в их состав фрагментов хромосомы грамположительных бактерий *B. subtilis* созданы высокоэффективные структуры, пригодные для проведения направленного мутагенеза *B. subtilis*. Мутагенез можно осуществлять путем рекомбинационной замены интактного гена на инактивированный *in vitro* (плазида рUC18 – рBioB1) либо за счет интеграции целостного вектора в заданный участок хромосомы *B. subtilis* (плазида рMTL21С – рBioF2). Применение метода рекомбинационного мутагенеза с помощью сконструированных плазмид дало возможность получить мутантов по структурным генам биотинового оперона бактерий вида *B. subtilis*. Такой подход можно использовать для индукции мутаций в любых генах грамположительных бактерий.

1. Воробьева Л.И. Микробиологический синтез витаминов. М., 1982.
2. Streit W.R., Entcheva P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. Vol. 61. P. 21.
3. Bullock W.O., Fernandez J.M., Stuart J.M. // Bio. Technology. 1987. Vol. 5. P. 376.
4. Norrander I., Kempe T., Messing I. // Gene. 1983. Vol. 26. P. 101.
5. Chambers S.P., Prior S.E., Barstow D.A., Minton N.P. // Gene. 1988. Vol. 68. № 1. P. 139.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., 1984.
7. Bron S. Plasmids // Molecular Biological Methods for *Bacillus* / Ed. C.R. Harwood. Chichester, 1990. P. 75.
8. Bower S., Perkins J.B., Yocum R.R., Novitt C.L., Rahaim P., Pero J. // J. Bacteriol. 1996. Vol. 178. P. 4122.

Поступила в редакцию 03.06.08.

Наталья Владимировна Чеписюк – аспирант кафедры микробиологии.

Владимир Антонович Прокулевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии.