

6. Patten C. L., Glick B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid // Can. J. Microbiol. – 1996. – V.42. – p.207-220.
7. Honma M., Shimomura T. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid // Agric. Biol. Chem. – 1978. – V.42(10). – p.1825-1831.
8. Маниатис, Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. - 479 с.
9. Blaha D., Prigent-Combaret C., Mirza M. S., Moenne-Locoz Y. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic *Proteobacteria* and relation with strain biogeography // FEMS Microbiol. Ecol. – 2006. – V.56. – p.455-470.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА

PENICILLIUM ADAMETZII ЛФ F-2044.1.17

Л.А. Жуковская¹, Р.В. Михайлова¹, Т.В. Семашко¹, А.Г. Лобанок¹,
Д.Г. Ярмолинский², Н.А. Картель²

¹ - ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

² - ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь
enzyme@mbio.bas-net.by

Глюкозооксидаза (ГО) (β -D-глюкозо: O₂-1-оксидоредуктаза, КФ 1.1.3.4.) – фермент класса оксидоредуктаз, катализирующий окисление β -D-глюкозы до β -D-глюконолактона и пероксида водорода. ГО относится к числу ферментов широко используемых в медицине [1], пищевой и химической промышленности [2-4].

Рентабельность производства ферментных препаратов в значительной степени зависит от активности продуцентов, для усовершенствования которых применяются различные методы, в том числе и методы генетической инженерии.

В лаборатории ферментов ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси» отобран *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 – продуцент ГО, характеризующийся морфологической и биохимической стабильностью [5]. Из ДНК данного гриба выделен и охарактеризован ген *gox*, кодирующий ГО [6].

Цель работы – сконструировать вектор, несущий ген *gox P. adametzii* ЛФ F-2044.1, провести трансформацию *P. adametzii* ЛФ F-2044.1, получить рекомбинантный штамм с повышенной по сравнению с исходным штаммом активностью ГО.

Вектор для трансформации *P. adametzii* ЛФ F-2044.1, несущий ген *gox* данного штамма, конструировали на основе плазмиды pNOM102, любезно предоставленной доктором Р. Punt (Wageningen Center for Food Sciences (WCFS), Wageningen, The Netherlands). Для этого ген *gox P. adametzii* ЛФ F-2044.1 встраивали в плазмиду pNOM102 под контроль промотора глицеральдегидфосфатдегидрогеназы *A. nidulans* и терминатора гена индолглицеролфосфатсинтазы *A. nidulans*. Для встраивания гена *gox* в плазмиду pNOM102 вводили полилинкер, несущий ряд дополнительных сайтов рестрикции. В буфер, содержащий 10 мМ трис-HCl (pH 8,0), 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА добавляли 100 пмоль олигонуклеотидов Linker NcoI-BamHI – F (CATGGATATCG-GTACCG) и Linker NcoI-BamHI – R (GATCCGGTACCG-ATATC). Смесь прогревали при 95°C 5 мин на водяной бане и медленно охлаждали до комнатной температуры. ДНК переосаждали спиртом и использовали для лигирования с плазмидой pNOM102, линеаризованной ферментами NcoI и BamHI. Строение полученного вектора исследовали с использованием рестрикционного анализа. Сконструированный вектор назван pNOM102-GOX (рис. 1).

В связи со сложностью репликации крупных плазмид для трансформации мицелиальных грибов обычно используют 2 вектора: экспрессионный и селективный [7]. В качестве селективного вектора нами использовался p35S-NptII, несущий кассету, состоящую из 35S промотора вируса цветной мозаики капусты, гена неомизин-фосфотрансферазы II (NptII) и

терминатора 35S (кит pGreen [8]), и придающий трансформантам устойчивость к генетицину (рис. 2). Для прямой трансформации вектор линейризован EcoRV.

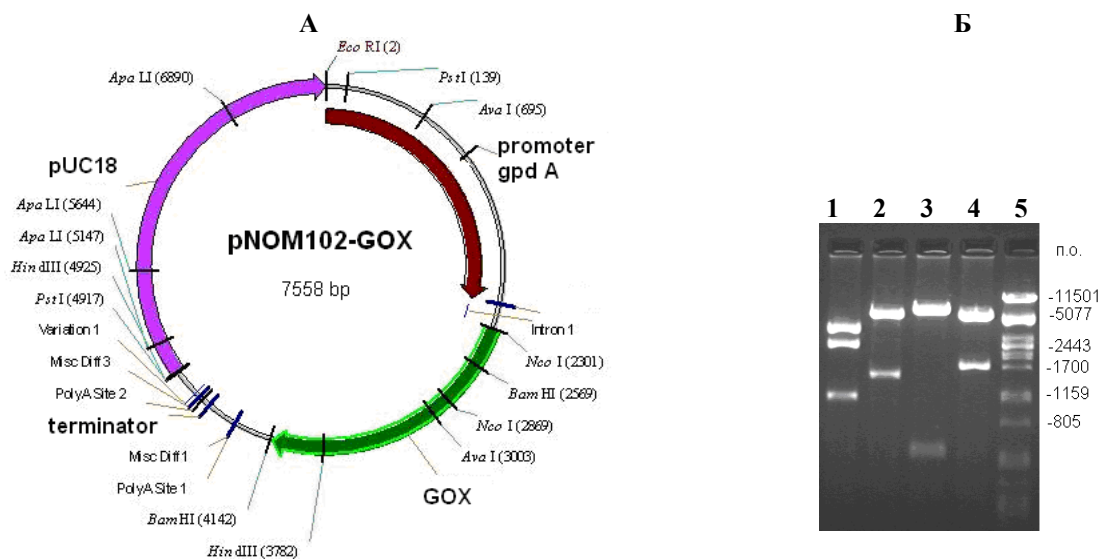


Рис. 1. Карта вектора pNOM102-GOX (А) и ее рестрикционный анализ (Б): вектор pNOM102-GOX, обработанный рестрикционными эндонуклеазами EcoRI+HindIII (1), VamHI (2), NcoI (3), EcoRV (4), маркерная ДНК фага λ, обработанная рестриктазой PstI (5)

Протопласты *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 получали ферментативным методом с использованием препарата литических ферментов из *Trichoderma harzianum* («Sigma», США). Трансформацию протопластов *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 осуществляли при помощи метода электропорации на приборе «CellJectPro» («Thermo Electron Corporation», США).

Трансформанты отбирались в два этапа. На первом этапе – по устойчивости к селектирующему агенту, на втором – по результатам ПЦР-анализа.

Отобрано 36 трансформантов *P. adametzii*, устойчивых к генетицину. Генетический анализ трансформантов проводили при помощи ПЦР. Установлено, что среди них 19 штаммов содержали вектор pNOM102-GOX, несущий ген *gox* *P. adametzii* ЛФ F-2044.1, и вектор p35S-NptII, несущий ген устойчивости к антибиотику генетицин, а 17 штаммов – только вектор p35S-NptII.

Проведенный анализ биосинтеза ГО рекомбинантными штаммами, содержащими оба трансформированных вектора при их глубинном культивировании позволил отобрать штамм *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17, характеризующийся повышенным уровнем синтеза ГО (186,8%) и продуцирующей способностью мицелия (255%) по сравнению с исходной культурой.

Таким образом, в результате проведенной работы сконструирован вектор pNOM102-GOX для трансформации гена *gox* *P. adametzii* ЛФ F-2044.1, проведена трансформация *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 и получен рекомбинантный штамм *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17 – продуцент ГО.

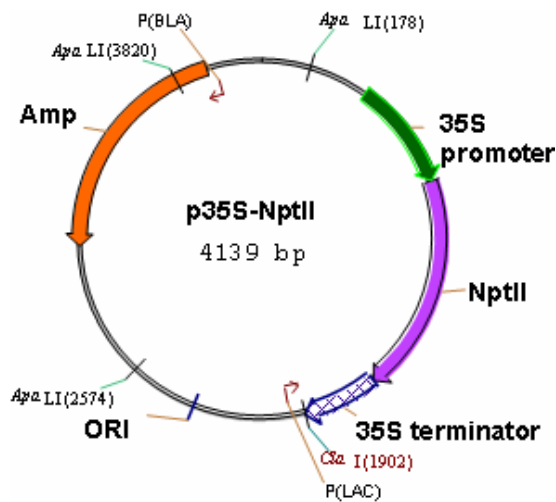


Рис. 2. Карта вектора p35S-NptII.

1. В.И. Билай, И.М. Пидопличко, Н.Я. Артемчук Распространение глюкозооксидаз у разных видов рода *Penicillium* Lk // Белки в медицине и народном хозяйстве / Отв. ред. М.Ф. Гулый – Киев. – 1965. – С. 124–131.
2. Л.М. Андеркофлер Производство и применение ферментных препаратов в пищевой промышленности / Под ред. Р.В. Фениксовой – М. – 1963. – С. 73–88.
3. M. Roehr, Ch.P. Kubicek, I. Kominek Gluconic acid // Biotechnology / Ed. by H.S. Rehm, G. Reed – 1996. – Vol. 6. – P. 347–362.
4. B.A. Alberti, A.M. Klibanov Preparative production of hydroquinone from benzoquinone catalysed by immobilized D-glucose oxidase // Enzyme Microb. Technol. – 1982. – Vol. 4, № 1. – P. 47–49.
5. Р.В. Михайлова, Л.А. Жуковская, А.Г. Лобанок Изучение спонтанной изменчивости *Penicillium adametzii* ЛФ F-2044 – продуцента глюкозооксидазы // Прикл. Биохим. и микробиол. – 2007. – Т.43, № 2. – С. 207-211.
6. Л.А. Жуковская, Д.Г. Ярмолинский, Р.В. Михайлова, Т.В. Семашко, Н.А. Кармель, А.Г. Лобанок Секвенирование и характеристика гена глюкозооксидазы *Penicillium adametzii* ЛФ F-2044.1 // Весті Нац. Акад. Навук Беларусі. – 2008. – №1. – С. 69-73.
7. R.B. Diez Strategies for the transformation of filamentous fungi // Journal of Appl. Microbiol. – 2002. – Vol. 92. – P. 189-195.
8. H.P. Roger et al. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation // Plant Mol. Biol. – 2000. – Vol. 42. – P. 819-832.

ЭКЗОН-ИНТРОННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОВ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ПРОТИСТОВ

А.Т. Иващенко, А.А. Кабдуллина

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан
a_ivashchenko@mail.ru

Экзон-интронная организация генов характерна для геномов высших эукариот. Например, геномы человека, крысы, риса, арабидопсиса, дрозофилы, нематоды содержат таких генов более 80% [1-4]. Доля генов с интронами в геномах низших эукариот изменяется в широких пределах. Геномы грибов содержат от 0.3% генов с интронами до 97% таких генов. Полностью секвенированные геномы протистов тоже имеют большой диапазон изменения доли генов с интронами. Например, геномы *Leishmania infantum*, *Trypanosoma brucei*, *Cryptosporidium parvum* содержат единичные гены в каждой хромосоме, а в геномах *Dictyostelium discoideum*, *Plasmodium falciparum*, *Paramecium tetraurelia* и *Theileria parva* таких генов более 50%. Кроме варьирования числа генов с интронами в геномах протистов, проявляется различное отношение длин экзонов и интронов в каждом геноме. Представляется важным выяснить закономерности в экзон-интронной организации генов протистов и установить ее особенности в геноме каждого вида.

Нуклеотидные последовательности геномов *P. falciparum*, *D. discoideum*, *P. tetraurelia* и *T. parva* получены из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Гены распределяли в выборки с 1, 2, 3, 5, 6-9, 10-14, 15 и более интронами в гене. Определяли длину экзонов (L_{ex}), интронов (L_{in}), сумму длин экзонов (L_{ex}) в гене, длину гена (L_{gn}) и долю длины экзонов (L_{ex}/L_{gn}) в гене. N_{in} – число интронов в гене, N_{gn} – число генов в выборке. Анализировали количество интронов и экзонов с длиной в интервалах 1-20, 21-40, 41-60 н. и так далее до 400 н., а также с длиной более 400 н.

Из полностью секвенированных геномов нескольких видов протистов только четыре (*P. falciparum*, *D. discoideum*, *P. tetraurelia* и *T. parva*) имеют существенную долю генов с экзон-интронной организацией. Изученные геномы имеют соответственно 55, 69, 83 and 75% генов с интронами. Длина безинтронных генов этих организмов равна 2351, 1037, 1129 and 1642 н. которая больше в 2.2, 1.4, 1.8 and 2.6 раза чем средняя длина экзонов в одноинтронных генах. Увеличение числа интронов в генах *P. falciparum*, *D. discoideum*, *P. tetraurelia* и *T. parva* ведет к снижению средней длины экзонов соответственно в 5.8, 3.9, 2.0 and 2.7 раза (Таблица). Такое значительное уменьшение средней длины экзонов