

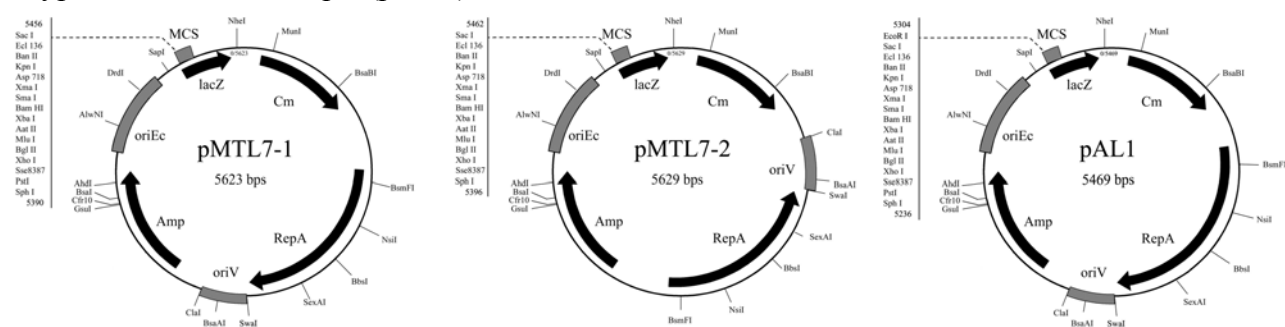
- Иванюк В.Г., Банадысев С.А., Журомский Г.К. Фитофтороз картофеля и меры борьбы с ним: Аналитический обзор.- Минск: Белорусский научный институт внедрения новых форм хозяйствования в АПК, 2003.- 56 с.
- Журомский Г.К. Расовый состав *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary – возбудителя фитофтороза картофеля в условиях Беларуси // Ахова раслін: Двухмесячный науч.-произв. журнал.- 1999.-№5- С.30-31.
- Goodwin S.B. The population genetics of *Phytophthora* // Phytopatology. – 1997. – V.87, №4. – P.462 – 473.
- Дьяков Ю.Т., Еланский С.Н. Популяционная генетика *Phytophthora infestans* // Микология сегодня. – 2007. – Т.1, №1. – С.107 – 139.
- Griffith G. W., Shaw D. S. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions // Applied and Environmental microbiology. - 1998. - Vol. 64. - P. 4007 – 4014.

## ПЛАЗМИДЫ СЕМЕЙСТВА pBS72 КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВЕКТОРНЫХ СИСТЕМ

**В.А. Чалей, А.В. Лагодич, М.А. Титок**

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь  
lagodichav@bsu.by, titok@bsu.by*

Бактерии *Bacillus subtilis* в силу своей способности утилизировать широкий спектр органических и неорганических субстратов, продуцировать во внешнюю среду биологически активные соединения (ферменты, антибиотики, стимуляторы роста растений) являются востребованными объектами биотехнологического производства. Использование векторных молекул с клонированным генетическим материалом является общепринятым и широко используемым приемом для улучшения свойств штаммов-продуцентов. В качестве векторов, как правило, используются внехромосомные генетические элементы, наиболее перспективными из которых являются плазмиды, реплицирующиеся согласно механизма тета-типа. Нами было описано новое семейство плазмид этой группы, представители которого были выделены из природных штаммов *B. subtilis*, изолированных на территории Беларуси. Изучение молекулярно-генетической организации *rep*-областей выделенных плазмид путем секвенирования и функционального анализа делеционных и инсерционных изменений внутри клонированных мини-репликонов, а так же характера наследования полученных мини-репликонов показало, что плазмиды семейства pBS72 обладают высоким потенциалом для конструирования на их основе векторных конструкций. Используя репликон плазмиды тета-типа pBS72 и плазмиды pMTL21C [1] были сконструированы двурепликонные векторы (рис. 1).



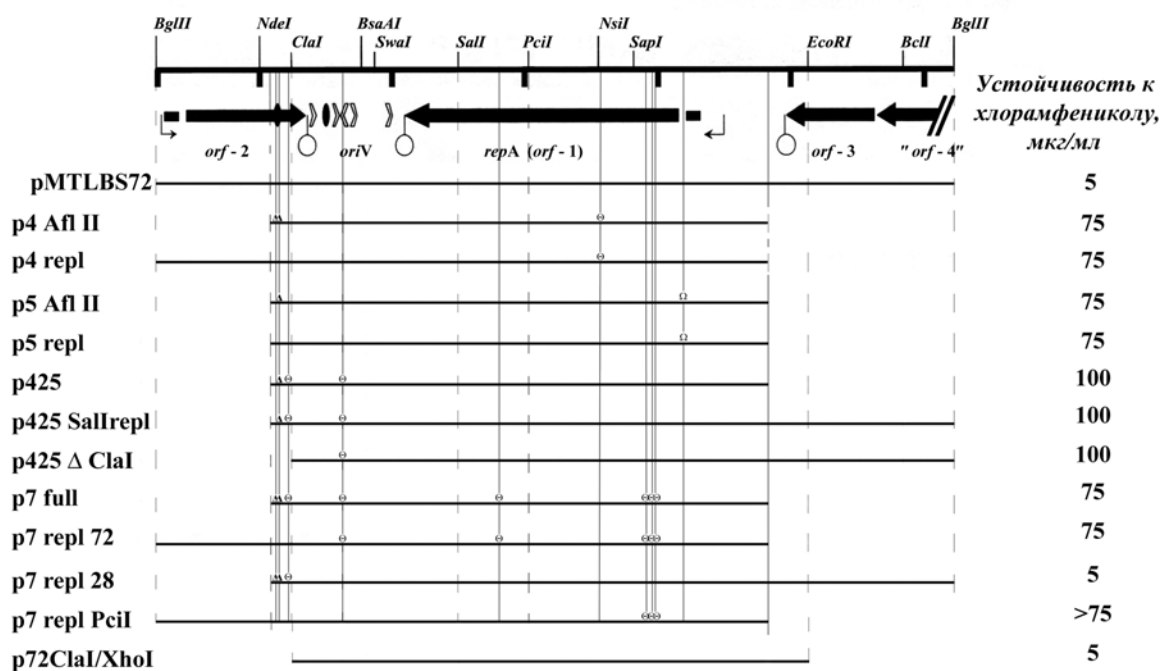
**Рис. 1.** Молекулярно-генетическая организация векторов общего назначения.

На рисунке указана локализация сайтов рестрикции и детерминант: oriEc – ColE1-репликон; oriV и Rep – *rep*-область плазмиды pBS72; MCS - полилинкер размером 78 bp, несущий 16 сайтов, пригодных для молекулярного клонирования, фланкирован праймерами M13/pUC, расположен в N-терминальной последовательности гена *lacZ* (под контролем *tac*-промотора, индуцируемого в клетках *E. coli*); маркеры устойчивости к ампициллину (Amp) и хлорамфениколу (Cm), соответственно в клетках *E. coli* и *B. subtilis*.

Нами было показано, что ориентация клонированной *rep*-области не оказывает влияния на способность плазмиды наследоваться в клетках *E. coli* и *B. subtilis*, а эффективность

трансформации клеток *E. coli* и *B. subtilis* препаратами плазмидной ДНК составляет  $10^6$  и  $10^5$  клеток на 1 мкг ДНК, соответственно [2].

Созданные векторы в равной степени пригодны для клонирования в системах *E. coli* и *B. subtilis*. При этом число плазмидных копий в реципиентных бактериях *E. coli* соответствует ColEI-репликону, а в бактериях *B. subtilis* - репликону рBS72 (5-6 копий) [3]. Полученный вектор характеризуется высокой емкостью (до 10 т.п.н) и выраженной структурной и сегрегационной стабильностью в клетках бактериальных хозяев *E. coli* и *B. subtilis*. Для созданной конструкции известна полная нуклеотидная последовательность ДНК, что позволяет осуществлять с ней различного рода манипуляции, в том числе создавать новые векторные молекулы (например, векторы специального назначения), что и было предпринято в дальнейшем. Варианты с измененным числом копий могут служить основой для конструирования векторных систем, а также для изучения тонких механизмов репликации и сегрегации. Для изменения числа копий мини-репликона плазмиды рBS72, детерминирующего устойчивость к хлорамфениколу в концентрации 5 мкг/мл использовали химический мутагенез *in vitro* (гидроксилламин). Мутантные конструкции были отобраны путем прямой селекции трансформантов *B. subtilis* 168 *trpC2* на средах с повышенной концентрацией хлорамфеникола (50 мкг/мл). Мутационные изменения, приводящие к увеличению числа копий плазмидного репликона, были картированы путем секвенирования. На основании анализа электрофореграмм было установлено увеличение отношения фракций плазмидной ДНК к хромосомной от 2 до 10 раз по сравнению с исходным вариантом, что свидетельствовало об увеличении числа копий исследуемых мутантов.



**Рис. 2.** Генетическая организация гер-области плазмиды рBS72, локализация мутаций.

BglII-фрагмент плазмиды рMTLBS72 размером 3081 п.н. содержит: три полных (orf - 1-3) и одну неполную ("orf - 4") открытые рамки считывания; регуляторные участки (◀ промотор, ■ последовательность Шайн-Дальгарно, ○ терминатор); повторы (⌢ – правая ориентация, ⌡ – левая ориентация); DnaA связывающие последовательности (●). Открытые рамки считывания ((orf - 1-4) детерминируют синтез полипептидов, состоящих из 344, 168, 113, 87 аминокислотных остатков, соответственно. Обозначения мутаций: инсерции (Ω), делеции (Δ), транзиции и трансверсии (Θ). Для репликации плазмиды необходимы ген *repA* и область, содержащая в своем составе оридгин вегетативной репликации *oriV* (соответствует конструкции р72Cla/Xho).

Мутации были выявлены в области *dnaA*-бокса, *oriV*-сайте и *repA*-гене (рис. 2). В последовательности *dnaA*-бокса, примыкающего к сайту *oriV*, обнаружены три точечные делеционные мутации, причем одна из них, присутствовала во всех проанализированных

вариантах. В области *oriV* достаточно часто обнаруживалась замена аденина на гуанин в последовательности инвертированного повтора (обнаружена у пяти из семи проанализированных мутантов). В пределах *repA*-гена выявлены трансверсии и транзиции, приводящие к изменению в области домена полипептидной цепи *RepA*, предположительно обладающего ДНК-связывающей активностью, а также транзиции в области характерной для доменов с АТФ-азной активностью. Подобно исходному мини-репликону плазмиды pBS72 все исследованные мутантные варианты характеризовались стабильностью наследования в клетках типового штамма *B. subtilis* 168 *trpC2* и утрачивались с частотой более 90 % из бактерий *B. subtilis* L1432, несущих мутацию гена *dnaB19*. Исключение составил вариант, содержащий транзицию в области инвертированного повтора *oriV* сайта и делецию последовательности *dnaA*-бокса (стабильность наследования увеличилась в 10 раз). Исходя из возможных функций белка *DnaB*, можно предположить, что изменение в области инициации репликации приводит не только к изменению числа копий, но также влияет на процессы распределения дочерних молекул плазмидной ДНК в процессе деления.

У всех мутантов были обнаружены изменения в терминальной области *orf2*. Поскольку в использованном мини-репликоне *orf2* является неполной, а одна из делеций характерна для всех охарактеризованных мутантов, то возникшие изменения копийности могут быть связаны в т.ч. с функцией *dnaA*-бокса, локализованного в пределах *orf2*, и примыкающих к нему областей. Интересно, что одна из транзиций *mut7* затрагивает центральный район инвертированного повтора области *oriV* (ttaaAatttaa → ttaaGatttaa), и может изменять его предполагаемую функцию мишени для посадки регуляторной молекулы. Помимо описанных выше мутаций у *mut4* в пределах *repA*-гена выявлена трансверсия G→T в позиции 286, приводящая к замене A→S (97) в области ДНК-связывающего домена полипептидной цепи *RepA*, а у *mut7* - 4 транзиции A→G в позициях 82, 85, 152, 607, приводящие к аминокислотным заменам K→E (28), R→G (29), E→G (51) того же домена *RepA*, и в области домена, ответственного за АТФ-азную активность - N→D (223).

У *mut5* выявлена инсерция С между старт-кодом *repA*-гена и последовательностью Шайн-Дальгарно (RBS): 5'- gatcgcgaggaggCacattATG -3', что может изменить уровень экспрессии *repA*-гена и, как следствие, концентрацию *RepA* в клетке. На следующем этапе работы были осуществлены эксперименты по установлению связи между типом мутационного изменения и его фенотипическим проявлением, детектируемым по уровню устойчивости к антибиотикам, данные представлены на рис. 2. Настоящая работа посвящена изучению молекулярно-генетической организации плазмид  $\theta$ -типа бактерий *B. subtilis*, выделенных из различных природных источников на территории Беларуси, и их использованию при создании векторов для молекулярного клонирования в клетках грамотрицательных (*E. coli*) и грамположительных (*B. subtilis*) бактерий. Была создана система бирепликонных векторов, которые эффективно трансформируют клетки *E. coli* и *B. subtilis* ( $10^6$  и  $10^5$  клеток на 1 мкг ДНК), структурно и сегрегационно стабильны, однако копийность указанных векторов в клетках *B. subtilis* не велика (5-6 копий). С использованием химического мутагенеза удалось получить варианты, демонстрирующие устойчивость к повышенным концентрациям антибиотика и предположительно увеличенное число копий.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта БРФФИ Б08М-131.

1. Chambers S.P., Prior S.E., Barstow D.A., Minton N.P. The pMTL nic- cloning vectors. I. Improved pUC polylinker regions to facilitate the use of sonicated DNA for nucleotide sequencing//Gene. – 1988. – Vol. 68, № 1. – P. 139–149. Lagodich A.V., Cherva E.A., Shtaniuk Ya.V., Prokulevich V.A., Fomichev Yu.K., Prozorov A.A., Titok M.A. Construction of a Vector System for Molecular Cloning in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* // Molecular Biology. – 2005. – Vol. 39, № 2. – P. 306–309. Titok M.A., Chapuis J., Selezneva Y.V., Lagodich A.V., Prokulevich V.A., Ehrlich S.D., Janniere L. *Bacillus subtilis* soil isolates: plasmid replicon analysis and construction of a new theta-replicating vector // Plasmid. – 2003. – Vol. 49, № 1. – P. 53–62.