

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПЛАЗМИД ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ ГЕНА КСИЛОЗОИЗОМЕРАЗЫ *ARTHROBACTER SP.* В РАЗЛИЧНЫХ БАКТЕРИЯХ

Е.А.Шляхотко¹, Л.И.Сапунова¹, А.Н.Евтушенков²

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

e-mail: enzute@mbio.bas-net.by

²Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

e-mail: evtushenkov@bsu.by

Ксилозоизомераза (D-ксилоза кетол-изомераза, КФ 5.3.1.5) является одним из наиболее востребованных микробных катализаторов, применяемых для коммерческого получения глюкозо-фруктозных сиропов и кристаллической фруктозы. Наиболее эффективным путем повышения рентабельности производства указанных натуральных заменителей сахара является создание новых высокопродуктивных штаммов-продуцентов, в первую очередь методами генно-инженерных технологий. Это требует выделения и всестороннего исследования структуры генов, кодирующих фермент *xylA*, создания систем для их клонирования и эффективной экспрессии в рекомбинантных организмах.

Ранее нами был отобран штамм бактерий *Arthrobacter sp.* – высокоактивный продуцент ксилозоизомеразы, изомеризирующей ксилозу в ксилулозу и глюкозу во фруктозу [1]. Ген этого фермента выделен, определены его нуклеотидная и аминокислотная последовательности [2, 3]. В составе вектора *pUC18* под контролем собственного конститутивного промотора *xylA* ген *Arthrobacter sp.* клонирован в клетках *Escherichia coli* HB101, а также в составе векторов *pET20b* и *pET24b* под контролем T7-промотора – в *E.coli* BL21(DE3) [4, 5].

Целью настоящей работы было конструирование плазмиды для клонирования гена ксилозоизомеразы *Arthrobacter sp.* в бактериях различной систематической принадлежности.

В работе использовали вектор широкого круга хозяев плазмиду *pJQ200KS* и бирепликонный вектор *pMTL7-1*, способный к репликации в клетках *E.coli* и *Bacillus*. Указанные векторы и плазмиду *pUC18*, содержащую ген ксилозоизомеразы *Arthrobacter sp.*, подвергали рестрикции ферментами *SmaI* и *XbaI*, после чего полученные смеси разделяли в 1%-ном агарозном геле. Фрагменты ДНК, содержащие ген *xylA* с собственным промотором и линейаризованные векторы *pJQ200KS*, *pMTL7-1*, выделяли и очищали на колонке со стеклянным адсорбентом в соответствии с инструкциями производителя (Fermentas). Очищенные линейаризованные векторы *pJQ200KS* и *pMTL7-1* лигировали с избыточным количеством фрагментов ДНК, содержащих ген ксилозоизомеразы, при 4°C в течение 18 ч. Лигированной смесью трансформировали бактерии *Escherichia coli* *XL1-blue*, которые затем высевали на полноценную агаризованную среду, содержащую селективный агент (гентамицин, для вектора *pJQ200KS*; ампицилин, для вектора *pMTL7-1*), индуктор лактозного оперона (изопропил-1-тио-β-D-галактопиранозид) и субстрат β-галактозидазы (X-gal).

Для быстрого скрининга рекомбинантных клонов и выявления гена ксилозоизомеразы в составе векторов *pJQ200KS*, *pMTL7-1* использовали следующие праймеры: **GCGAATTCTCAGCGGGCGCCAGCA** (*xylA*-end) и **CATCATATGACTCTTCAGCCAACCC** (*xylA*-start).

В результате проведенных исследований отобраны клоны *E.coli* *XL1-blue*, на селективной среде формирующие характерные белые колонии и синтезирующие каталитически активную форму ксилозоизомеразы. Данные рестрикционного анализа

плазмидных ДНК отобранных трансформантов свидетельствовали о наличии гена ксилоизомеразы *Arthrobacter* sp с собственным промотором. в структуре сконструированных плазмид pJQ200KSxylA и pMTL7-1xylA.

Методом электропорации плазмид pJQ200KSxylA и pMTL7-1xylA в клетки бактерий были получены рекомбинантные штаммы грамотрицательных и грамположительных бактерий родов *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Sarcina* обладающие ксилоизомеразной активностью. Проведено изучение экспрессии клонированного гена xylA в клетках различных видов грамотрицательных и грамположительных бактерий.

Таким образом, в результате выполненной работы сконструированы плазмиды pJQ200KSxylA, pMTL7-1xylA и получены содержащие ее рекомбинантные бактерии, принадлежащие к различным видам родов *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Sarcina*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lobanok A.G., Sapunova L.I., Dikhtievski Ya.O., Kazakevich I.O. Screening of glucose isomerase producing microorganisms // World Journal of Microbiology and Biotechnology.- 1998.- Vol. 14, № 2.- P.259-262.
2. Шляхотко Е.А., Сапунова Л.И., Лобанок А.Г., Евтушенков А.Н. Клонирование, секвенирование и экспрессия гена xylA *Arthrobacter nicotianae* // Материалы Международной конф. «Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития», 6-12 июня 2004 г.- Москва, 2004.- Т.1.- С.417.
3. Шляхотко Е.А., Евтушенков А.Н., Сапунова Л.И., Лобанок А.Г. Секвенирование гена xylA *Arthrobacter nicotianae* // Матер. Междунар. конф. «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии», Минск, 26-28 мая 2004 г.- Минск: ОДО «НоваПринт», 2004.- С.166-169.
4. Евтушенков А.Н., Селезнева Ю.В., Зеленова Е.А., Сапунова Л.И., Лобанок А.Г. Молекулярное клонирование гена ксилоизомеразы xylA *Arthrobacter* species в клетках *Escherichia coli* HB101 // Матер. Междунар. конф. «Микробиология и биотехнология XXI столетия», Минск, 22-24 мая 2002 г.- Мн., 2002.- С.132-134.
5. Шляхотко Е.А., Лобанок А.Г., Сапунова Л.И., Казакевич И.О., Евтушенков А.Н. Характеристика ксилоизомеразы, продуцируемой рекомбинантным штаммом *Escherichia coli* // Матер. III Московского Междунар. конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 14-18 марта 2005 г.- М.: