

Ю.А. Шилова, Е.Г. Веремеенко, Н.П. Максимова

**РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОПИЙНОСТИ ВСТАВКИ
ИНТЕГРАТИВНОГО СУИЦИДАЛЬНОГО ВЕКТОРА PK18MOB
В ГЕНОМЕ PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS SSP. AURANTIACA**

**DEVELOPMENT OF APPROACHES FOR DETERMINING THE INSERTING COPIES
OF THE INTEGRATIVE SUICIDAL VECTOR PK18MOB
IN THE GENOME OF PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS SSP. AURANTIACA**

Глобальный транскрипционный регулятор PsrA способен влиять на продукцию феназиновых антибиотиков у бактерий *Pseudomonas chlororaphis*. Для изучения роли этого транскрипционного фактора было проведено нокаутирование гена *psrA* при помощи интегративного суицидального вектора pK18mob. Анализ полученных генно-инженерных штаммов показал, что вставка вектора произошла только в целевую область хромосомы бактерий *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* и дополнительные копии данного вектора в геноме отсутствуют.

Ключевые слова. Феназиновые антибиотики, транскрипционный фактор PsrA, *Pseudomonas*

The global transcriptional regulator PsrA is able to influence the production of phenazine antibiotics in bacteria *Pseudomonas chlororaphis*. The *psrA* gene was knocked out using the integrative suicidal vector pK18mob, with the aim of study the role of this transcription factor. Analysis of the obtained genetically engineered strains showed that the insertion of the vector occurred only in the target region of the chromosome of bacteria *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* and there are no additional copies of this vector in the genome.

Keywords: Phenazine antibiotics, transcription factor PsrA, *Pseudomonas*.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Минск, Беларусь.

Получение высокоактивных бактерий-продуцентов вторичных метаболитов осуществляется посредством различных подходов и методов. В настоящее время использование генно-инженерных методик с учетом сведений о регуляции синтеза целевого метаболита позволяет получить сверхпродуктивные штаммы [1]. Из литературных источников известно, что выключение генов, продуктами которых являются ингибиторы транскрипции, является одним из наиболее эффективных

подходов к увеличению синтеза целевого метаболита [1; 2]. Бактерии *P. chlororaphis* ssp. *aurantiaca* способны к продукции фенозиновых антибиотиков, которые находят широкое применение в сельском хозяйстве и промышленности [3; 4]. Было установлено, что оперон, включающий гены биосинтеза фенозинов, у данных бактерий регулируется quorum sensing системой (QS) PhzIR, гены которой расположены непосредственно перед его промотором [5]. Регуляция транскрипции QS-системы осуществляется напрямую или опосредованно различными транскрипционными факторами. Установлено, что у бактерий *P. chlororaphis* принимать участие в регуляции синтеза фенозинов может глобальный транскрипционный регулятор PsrA. Для определения роли PsrA в регуляции продукции фенозинов у штамма *P. chlororaphis* ssp. *aurantiaca* было проведено кокаутирование его гена с помощью суицидального интегративного вектора pK18mob.

Материалы и методы

Объект – штамм *P. chlororaphis* ssp. *aurantiaca* B-162 (коллекционный номер КМБУ В-162). В работе использовали штамм *E. coli* XL-1Blue (F'proABlacIqacZAM15Tn10/recA1gyrA96(Narr) thi-1hsdR17 supE44relA1lac), мобилизирующий штамм из коллекции кафедры молекулярной биологии БГУ *E. coli* BW19851 (*recA*, Ω RP4 *tra*, *uidA*:: *pir*⁺). Для клонирования использовали вектор pTZ57R/T («МБИ Ферментас», Литва) и суицидальный интегративный вектор pK18mob [6]. Бактерии *E. coli* и *P. chlororaphis* ssp. *aurantiaca* культивировали в стандартных питательных средах при температуре 37 °C и 28 °C, соответственно. Тотальную ДНК выделяли фенольным методом. Выделение плазмид, трансформацию и электрофорез проводили согласно стандартным протоколам [7, 8].

Праймеры для ПЦР полноразмерного гена *psrA* с навесками для рестриктазы BamHI: прямой 1PF *gcggtaccGAGTAGCCATGGCCCA*; обратный – 1PR *gcggtaccACGGTCAGGCCTTGGC*. ПЦР проводили в смеси стандартного состава с использованием ThermoHybaib PX2 по следующей схеме: I) 2 мин при 94 °C; II) 30 циклов: 94 °C 1 мин; 52 °C 30 с; 72 °C 1 мин; III) 72 °C 10 мин.

Для амплификации срединного участка гена размером 230 п.о. использовали праймеры *psrA* с навесками для рестриктазы BamHI: 1SF – *ggatccCATGAAGTGCACAACG* и 2SR – *ggatccAGAGCTGCTGGAATC*. Параметры амплификации: I) 1 мин при 94 °C; II) 10 циклов: 94 °C 30 с; 59 °C 30 с; 68 °C 1 мин; III) 20 циклов: 94 °C 30 с; 53 °C 30 с; 68 °C 1 мин; IV) 70 °C, 5 мин.

Для идентификации инсерции генно-инженерной конструкции на основе плазмиды pK18mob в область хромосомного *psrA*-гена проводили ПЦР-анализ с использованием смеси полимераз Taq и Pfu и праймеров к полноразмерному гену. ПЦР-анализ на наличие генно-инженерной конструкции в составе бактериальной хромосомы осуществляли по следующей программе амплификации: I) 3 мин при 94 °C; II) 30 циклов: 94 °C 1 мин; 55 °C 30 с; 68 °C 3 мин; III) 68 °C, 5 мин. Использовали ПЦР-амплификатор C1000 Touch™ Thermal Cycler BIO RAD

Результаты и обсуждение

С целью получения фрагмента для гомологичной рекомбинации суицидального интегративного вектора pK18mob с участком хромосомы бактерий *P. chlororaphis* ssp. *aurantiaca*, в пределах которого расположен ген *psrA*, на основе си퀀са данной области (KR063269.1) были разработаны праймеры к центральной части гена. Полученный фрагмент, размером в 230 п.н. был клонирован в составе вектора pTZ57R/T. После чего данный фрагмент был вырезан по сайтам рестрикции и переклонирован в вектор pK18mob. Для проведения конъюгации вектор pK18mob230*psrA* был трансформирован в клетки мобилизирующего штамма *E. coli* BW19851. Полученные трансконъюганты, отобранные на селективной среде, были проанализированы на наличие вставки вектора pK18mob в область гена *psrA* с помощью нескольких подходов. В первом случае, проводили амплификацию, используя праймеры 1PF

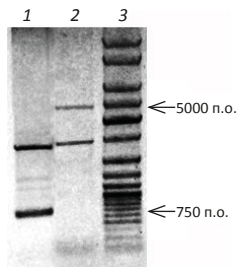


Рис 1
ПЦР-анализ трансконъюгантов полученных на основе *P. chlororaphis* ssp. *aurantiaca* B-162:

- 1 – штамм дикого типа B-162;
- 2 – рекомбинантный штамм B-162 pK18mob230*psrA*;
- 3 – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК Long Range DNA Ladder (100bp-10kb), Jena Bioscience

и 1PR к областям, фланкирующим ген *psrA* (рис. 1). У полученных генно-инженерных штаммов по сравнению с исходным отсутствует фрагмент размером 750 п.н., соответствующий полноразмерному гену, и появляется фрагмент размером около 4770 п.о., который соизмерим с расчетным значением для *psrA*-гена со вставкой

генно-инженерной конструкции (рис. 1). Эти данные указывают, что у всех полученных мутантов произошла вставка интегративного вектора в целевую область хромосомы.

Поскольку в векторе рK18mob области фланкирующие полилинкер несут последовательность для посадки праймеров M13, данные праймеры были использованы для второго подхода обнаружения вставки вектора. Так как ориентация вставки 230 п. н. в составе вектора рK18mob не была известна, были взяты все возможные комбинации праймеров M13 (F или R) и праймеров фланкирующих ген *psrA* (1PF или 1PR) (рис. 2).

На схеме видно (рис. 2 Г), что только при определенной комбинации праймера M13 и 1P можно получить ПЦР-продукт размером около 500 п. о. В зависимости от ориентации вставки интеграция вектора могла произойти двумя путями: так, что при использовании описанных выше комбинаций праймеров реакция амплификации будет проходить с праймерами 1PF + M13F и 1PR + M13R или 1PF + M13R и 1PR + M13F.

На рисунке 3 представлено, что у штамма дикого типа, взятого в качестве контроля, так как у него отсутствует соответствующая вставка, нет бендов в области 500 п. о. (дорожки 1–4). У рекомбинантных штаммов обнаруживаются фрагменты, соответствующие по размерам 500 п. о., при амплификации только с помощью комбинации праймеров 1PF + M13F и 1PR + M13R (дорожки 6 и 8). Полученные результаты подтверждают наличие вставки в области гена *psrA* и отсутствие интеграции вектора в другие части генома *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162.

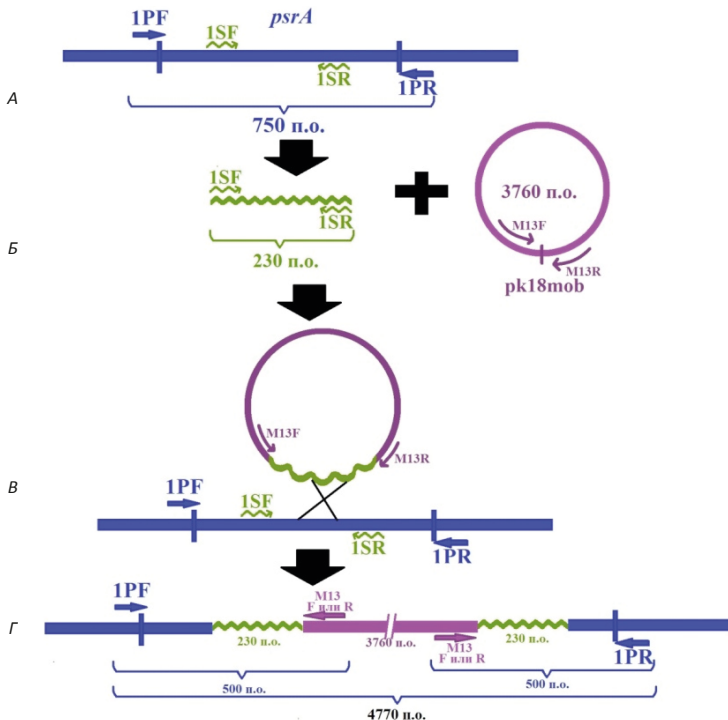


Рис. 2

Схема получения генно-инженерных штаммов *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162 рK18mob230*psrA*:

- А – расположение праймеров для клонирования фрагментов гена *psrA*;
- Б – клонирование участка центральной области гена *psrA* в вектор рK18mob;
- В – интеграция вектора рK18mob230*psrA* в области гена *psrA*;
- Г – участок хромосомы *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162 с интегрированным вектором рK18mob230*psrA*

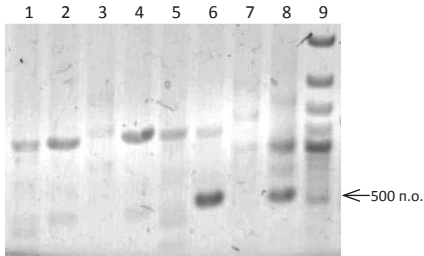


Рис 3
 Электрофореграмма анализа
 наличия вставки генно-инженерных штаммов
P. chlororaphis ssp. *aurantiaca*
 B-162 pK18mob230psrA

Использованные комбинации праймеров для штамма B-162:

1. M13F+1PR;
2. M13F+1PF;
3. M13R+1PR;
4. M13R+1PF.

Рекомбинантного штамма B-162 pK18mob230psrA:

5. M13F+1PR;
6. M13F+1PF;
7. M13R+1PR;
8. M13R+1PF;
9. маркер GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder.

Исходя из всех полученных данных, был сделан вывод, что рекомбинантные штаммы несут вставку вектора pK18mob в области гена *psrA*. Включение генно-инженерной конструкции произошло, исключительно, в целевую область, а случайные вставки в другие участки хромосомы отсутствуют.

Литература

1. Genetic engineering of *Pseudomonas chlororaphis* GP72 for the enhanced production of 2-Hydroxyphenazine / L. Kaiquan [et al.] // Microb Cell Fact. 2016. Vol. 15. № 13. P. 1–12.
2. Optimization of phenazine-1-carboxylic acid production by a *gacA*/*qscR*-inactivated *Pseudomonas* sp. M18GQ harboring pME6032Phz using response surface methodology / Q. Zhou [et al.] // Appl Microbiol Biotechnol. 2010. Vol. 86. P. 1761–1773.
3. Use of *Pseudomonas* species producing phenazine-based metabolites in the anodes of microbial fuel cells to improve electricity generation / T.H. Pham [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. Vol. 80, № 6. P. 985–993.
4. Isolation, identification and characterization of rice rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* PA1201 producing high level of biopesticide «Shenqinmycin» and phenazine-1-carboxamide / L. Zhou L., H. Jiang H., K. Jin, S. Sun, W. Zhang, X. Zhang, Y.W. He // Wei Sheng Wu Xue Bao. 2015. Vol. 55, № 4. P. 401–411.
5. Veremeenko E. G., Maksimova N. P. Increase of phenazine antibiotic production in bacteria *Pseudomonas aurantiaca* by cloning the cluster of *PhzIR*-genes // Advances in Medicine and Biology. 2012. Vol. 50. P. 195–206.
6. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* / Schafer A., Tauch A., Jager W., Kalinowski J., Thierbach G., Puhler A // Gene. 1994. V. 145. P. 69–73.
7. Sambrook J., Russel D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. New York. P. 2001–2344.
8. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии: Молекулярное клонирование / под ред. А. А. Баева. Москва, 1984.