

Юй Чао¹, М. Ю. Шонина², А. В. Лагодич³

УДК 579.841

^{1, 2, 3} Кафедра генетики, биологический факультет,
Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

ПОЛУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ ШИКИМАТНОГО ПУТИ У БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS*

В работе показана возможность трансформации штаммов *B. subtilis*, перспективных для создания штаммов-продуцентов шикимовой кислоты. Получены исходные ампликоны для создания генетических конструкций, предназначенных для интеграции в состав бактериальной хромосомы. Среди ампликонов выявлен генетический полиморфизм, который может являться следствием мутагенеза, используемого при получении штаммов-продуцентов триптофана. С использованием полученных ампликонов создана интеграционная система для направленной инактивации гена шикимат-киназы в клетках бактерий *B. subtilis*.

Ключевые слова: шикимовая кислота, шикимат-киназа, ампликон, интеграция, *Bacillus subtilis*.

Образец цитирования: Юй Чао, М. Ю. Шонина, А. В. Лагодич. Получение генетических конструкций для модификации шикиматного пути у бактерий *Bacillus subtilis* // София: электрон. науч.-просветит. журн. 2019. № 1. С. 28–32.

Yu Chao¹, M. Shonina², A. Lahodzich³

^{1, 2, 3} Department of genetics, faculty of biology,
Belarusian State University, Minsk, Belarus

OBTAINING GENETIC CONSTRUCTS FOR MODIFYING THE SHIKIMATE IN BACTERIA *BACILLUS SUBTILIS*

The article shows the possibility of transformation of *B. subtilis* strains that are promising for creating shikimic acid producing strains. The initial amplicons were obtained for the creation of genetic constructs intended for integration into the composition of the bacterial chromosome. Among the amplicons, genetic polymorphism has been identified, which may be the result of mutagenesis used in the preparation of tryptophan producing strains. Using the obtained amplicons, an integration system has been created for the targeted inactivation of the shikimate kinase gene in *B. subtilis* bacterial cells.

Keywords: shikimic acid, shikimate kinase, amplicon, integration, *Bacillus subtilis*.

For citation: Yu Chao, Shonina, M., & Lahodzich, A. (2019). Obtaining genetic constructs for modifying the shikimate pathway in bacteria *Bacillus subtilis*. *Sophia*, 1, 28–32 (in Russ.).

Авторы:

¹ Юй Чао – аспирант кафедры генетики биологического факультета БГУ.
cygoodluck1989@gmail.com

² Мария Юрьевна Шонина – аспирант кафедры генетики биологического факультета БГУ.
shonina89@gmail.com

³ Алексей Викторович Лагодич – кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики биологического факультета БГУ.
LagodichAV@bsu.by

Authors:

¹ Yu Chao – postgraduate student of the department of genetics of the faculty of biology, BSU.

² Maria Shonina – postgraduate student of the department of genetics of the faculty of biology, BSU.

³ Aliaksei Lahodzich – PhD in biology, associate professor of the department of genetics of the faculty of biology, BSU.

Шикимовая кислота и ее производные благодаря хиральным свойствам молекулы широко востребованы в фармацевтической промышленности. Шикимовая кислота является ключевым компонентом для синтеза препаратов, активно применяемых при химиотерапии раковых заболеваний, для лечения и профилактики заболеваний, вызываемых штаммами вируса гриппа; для ряда соединений шикимовой кислоты показана антикоагулянтная и антитромботическая активность и др. [9; 4].

У растений и микроорганизмов шикимовая кислота служит предшественником большого числа различающихся в функциональном отношении первичных и вторичных метаболитов, таких как: ароматические аминокислоты (фенилаланин, тирозин и триптофан), лигнин, фолиевая кислота, тетрациклин, убихиноны, фенольные и карболовые соединения, алкалоиды [8; 10], поэтому многие ее производные представляют интерес для сельского хозяйства и используются в качестве гербицидов и антибактериальных средств. Применение этих соединений основано на их способности блокировать шикиматный путь у организмов указанных систематических групп без негативного эффекта для млекопитающих и человека [13].

Одной из главных задач современной фармацевтической и медицинской химии является создание новых низкодозных безопасных и в тоже время эффективных препаратов на основе доступного сырья [16]. Однако шикимовая кислота таковым не является, хоть и высоко востребована для получения различных медицинских препаратов. Наличие широкого круга потенциальных областей применения шикимовой кислоты обуславливают постоянный поиск и апробацию различных способов ее получения [1]. По этой причине весьма целесообразным является поиск альтернативных источников этого сырья и модификация существующих способов его получения.

Целью работы являлось получение генетических конструкций для модификации шикиматного пути у бактериальных штаммов *B. subtilis*, обладающих способностью к повышенному синтезу триптофана и потенциально пригодных для получения на их основе продуцентов шикимовой кислоты.

В работе использовали бактериальные штаммы: *E. coli* – DH5 α [14] и XL1 – Blue [6]; *B. subtilis* – типовой штамм 168 trpC2 [2] и штаммы из коллекции кафедры генетики БГУ, характеризующиеся повышенным уровнем синтеза триптофана: *B. subtilis* КМБУ 2003, *B. subtilis* ВКПМ5434, *B. subtilis* ВНИИ Генетика-15 [9], и его производные C10, D3 и D4, полученные путем ступенчатого мутагенеза штамма *B. subtilis* ВНИИ Генетика-15 и последующего отбора мутантов, резистентных к структурным аналогам триптофана (уровень продукции L-триптофана составляет 10–12 г/л); и плазмиды: pMTL21C, pLAV1, pAL1 и pAL2 [10], pMUTIN4 [15].



Бактериальные культуры выращивали в жидких и на плотных питательных средах различного состава: LB [11] либо минимальной среде Spizizen [2]. Агаризованные среды содержали 1,5 % агара, источником углерода служила глюкоза в конечной концентрации 0,2 % (*E. coli*) и 0,5 % (*B. subtilis*). Аминокислоты, основания и витамины добавляли до конечной концентрации в 20, 10 и 1 мкг/мл соответственно.

Плазмидную ДНК из бактерий *E. coli* и *B. subtilis* выделяли методом щелочного лизиса [3], для выделения плазмид из клеток бактерий *B. subtilis* культуру плазмидо-содержащих бактерий выращивали при 30 °С. Тотальную ДНК исследуемых бактерий выделяли методом фенол-хлороформной экстракции и использовали в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции.

Трансформацию клеток бактерий *E. coli* и *B. subtilis*, предварительно переведенных в состояние компетентности, проводили согласно рекомендациям, приведенным в руководстве [11] и работах [2; 5]. Трансформацию штаммов *B. subtilis*, обладающих повышенным уровнем синтеза триптофана, проводили по модифицированной методике. Для трансформации использовали 100–150 нг плазмидной ДНК.

Фрагмент бактериальной хромосомы *B. subtilis*, содержащий гены *tmrB* и *aroI* – амплифицировали с помощью двух пар альтернативных праймеров (табл. 1). Для пары ShikF-NotI и ShikR-BamHI использовали следующие режимы амплификации: 94 °С – 5 минут (один цикл); 94 °С – 30 секунд, 52 °С – 30 секунд, 68 °С – 2 минуты (10 циклов); 94 °С – 30 секунд, 54 °С – 30 секунд, 68 °С – 2 минуты (20 циклов); 72 °С – 10 минут. Праймеры содержали на 5' концах сайты распознавания рестриктаз NotI и BamHI соответственно.

Для пары ShikF1-EcoRI и ShikR2-SacII использовали следующие режимы амплификации: 94 °С – 5 минут (один цикл); 94 °С – 30 секунд, 55 °С – 10 секунд, 54 °С – 25 секунд, 68 °С – 2 минуты (10 циклов); 94 °С – 30 секунд, 54 °С – 30 секунд, 68 °С – 1 минута 30 секунд (25 циклов); 72 °С – 5 минут. Праймеры содержали на 5' концах сайты для рестриктаз EcoRI и SacII соответственно.

Таблица 1

Последовательность и термодинамические характеристики праймеров, используемых для амплификации фрагмента бактериальной хромосомы *B. subtilis*, содержащий гены *tmrB* и *aroI*.

Название	Последовательность 5' – 3'	Температура плавления (T _m), °С	Доля GC, %
ShikF-NotI	GCGGCC GCG ATT AGT GTA AAG TGG TGA AC	53/61/52 (64/73/64)	43 (55)
ShikR-BamHI	ccGGAT CCG CCC AGA GAT ACG ATT TTG	54/61/55 (63/71/63)	52 (56)
ShikF1-EcoRI	gGAATTC CGG TAT GTA TCT GTC AGA GAA G	53/60/52 (60/69/59)	45 (45)
ShikR2-SacII	cCCGCG GGC CAC TTT TGA ATT GTG CTT GT	53/61/55 (60/69/59)	43 (45)

П р и м е ч а н и е. В последовательности праймеров использовали следующие обозначения: подчеркиванием обозначен сайт распознавания рестриктазы; полужирным шрифтом с разбивкой на триплеты обозначены комплементарные участки области первичной посадки праймера; строчными буквами обозначены нуклеотиды, необходимые для успешной работы используемых ферментов рестрикции. Числовые значения температуры плавления рассчитаны простым методом / с корректировкой по концентрации солей / по алгоритму ближайших соседей. Значения температуры плавления и доли GC, указанные в скобках, приведены для области вторичной посадки праймера.

При разработке праймеров использовали возможности интернет-ресурсов <http://www.bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html> и <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Химический синтез праймеров осуществляла компания «Праймтех» (Минск, Беларусь).

Используя в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции препараты тотальной ДНК, выделенной из штаммов, обладающих повышенной способностью к синтезу триптофана и типового штамма *B. subtilis* 168 trpC2, и указанные пары праймеров, были подобраны условия для получения целевого продукта. При оптимизации условий было установлено, что наибольший выход продукта амплификации наблюдается при снижении температуры отжига праймеров на 2 °С относительно теоретически рассчитанной, что может являться следствием полиморфизма областей посадки праймеров, возникшего при получении данных штаммов. Также модификация предусматривала понижение температуры стадии полимеризации с 72 °С (оптимальной для эффективной работы Taq-полимеразы) до 68 °С градусов (температуры, рекомендуемой для работы с АТ-богатыми матрицами). Указанные изменения позволили получить специфические продукты амплификации размером около 1 т. п. н. для всех проанализированных матриц. Для доказательства того, что полученные ампликоны имеют структуру, сходную с ожидаемой, полученные ампликоны были верифицированы с использованием рестриктаз HindIII и PstI и последующим электрофоретическим разделением в агарозном геле.

Анализ полученных электрофореграмм показал, что все полученные ампликоны имеют сходство в организации строения, но на основании электрофоретической подвижности выявляемых рестриктов могут быть разделены на две группы. К первой могут быть отнесены продукты, получаемые с препаратов тотальной ДНК следующих штаммов *B. subtilis*: ВКПМ5434, ВНИИ Генетика-15 D4 и КМБУ 2003–2; ко второй группе – ВНИИ Генетика-15 D3, ВНИИ Генетика-15 C10, КМБУ 2003–1 и 168 trpC2. Данные различия могут являться следствием серии мутагенезов, при помощи которых были получены используемые в работе штаммы.

Продукты амплификации, верифицированные посредством рестрикционного анализа, были клонированы в состав векторов pMTL21C и pMUTIN4. Отбор рекомбинантных молекул осуществляли с помощью трансформации клеток бактерий *E. coli* штаммов DH5α либо XL1–Blue лигированной смесью с обогащением по ключевым рестриктазам и селекцией на средах с X-Gal, IPTG, ампициллин 50–100 мкг/мл. Из полученных трансформантов выделяли плазмидную ДНК и проверяли на соответствие заданным характеристикам посредством рестрикционного и секвенс-анализа. По результатам последнего был отобран ряд молекул, у которых молекулярно-генетическая организация ключевых детерминант соответствует ожидаемым и которые могут быть использованы для направленной и регулируемой инактивации гена шикимат-киназы в клетках бактерий *B. subtilis*.

В результате выполнения данной работы были получены исходные ампликоны для создания генетических конструкций, предназначенных для интеграции в состав бактериальной хромосомы. Среди ампликонов был выявлен генетический полиморфизм, который может являться следствием мутагенеза, используемого при получении штаммов-продуцентов триптофана. С использованием полученных ампликонов создана интеграционная система для регулируемой направленной инактивации гена шикимат-киназы в клетках бактерий *B. subtilis*. Полученные результаты являются важной основой для дальнейшего конструирования продуцентов.

Литература

1. High shikimate production from quinate with two enzymatic systems of acetic acid bacteria / O. Adachi [et al.] // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2006. Vol. 70, № 10. P. 2579–2582.
2. *Anagnostopoulos C., Spizizen J.* Requirements for transformation in *Bacillus subtilis* // *J. of Bacteriology*. 1961. Vol. 81, № 5. P. 741–746.
3. *Birnboim H. L., Doly J.* A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA // *Nucleic Acids Research*. 1979. Vol. 7, № 6. P. 1513–1523.
4. Novel easily accessible glucosidase inhibitors: 4-hydroxy-5-alkoxy-1,2-cyclohexanedicarboxylic acids / B. Brazdova [et al.] // *Carbohydrate Research*. 2008. Vol. 344, № 3. P. 311–321.
5. *Bron S.* Plasmids // *Molecular Biological Methods for Bacillus* / ed. C. R. Harwood. Chichester, 1990. P. 75–174.
6. *Bullock W. O., Fernandez J. M., Short J. M.* XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection // *BioTechniques*. 1987. Vol. 5, № 3. P. 376–379.
7. *Lahodzieh A. V.* Plasmids of pBS72 family as a basis for creation of vector systems // *Biotechnology of the Future: affiliated to the Intern. Symposium «EU-Russia: Prospects for Cooperation in Biotechnology in the 7th Framework Programme»*, St.-Petersburg, 5–8 June 2006. Moscow, 2006. P. 47–48.
8. *Lingens F.* The biosynthesis of aromatic amino acids and its regulation // *Angewandte Chemie Intern. Ed.* 2003. Vol. 7, № 5. P. 350–360.
9. Prospecting for alternate sources of shikimic acid, a precursor of Tamiflu, a bird-flu drug / T. R. Raghavendra [et al.] // *Current Science*. 2009. Vol. 96, № 6. P. 771–772.
10. *Ruohong S.* Separation of shikimic acid from pine needles // *Chem. Engineering & Technology*. 2008. Vol. 31, № 3. P. 469–473.
11. *Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T.* Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab.; Cold Spring Harbor Pub., 1989. 468 p.
12. *Сенаторова В. Н.* Исследование процесса и создание технологии биосинтеза L-триптофана штаммом-продуцентом *Bacillus subtilis* ВНИИгенетика-15: автореф. дис. ... канд. тех. наук: 03.00.23. Москва, 2000. 22 с.
13. *Shinada T., Yoshida Y., Ohfuné Shinada Y.* Direct conversion of 1,2-diol into allyl sulfide. Regioselective transformation of (–)-quinic acid to (–)-shikimic acid // *Tetrahedron Letters*. 1998. Vol. 39, № 33. P. 6027–6028.
14. *Taylor R. G., Walker D. C., McInnes R. R.* E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing // *Nucleic Acids Research*. 1993. Vol. 21, № 7. P. 1677–1678.
15. *Vagner V., Dervyn E., Ehrlich S. D.* A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis* // *J. of Microbiology*. 1998. Vol. 144, № 11. P. 3097–3104.
16. New approach to the total synthesis of (–)-zeylenone from shikimic acid / Y. Zhang [et al.] // *Chemical & Pharmaceutical Bull.* 2006. Vol. 54, № 10. P. 1459–1461.