

## СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ НОКАУТА ГЕНОВ ДАГФ-СИНТАЗ I ТИПА У *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* SUBSP. *AURANTIACA* B-162

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

Белорусский государственный университет, Минск,  
*angela.bobarikina@gmail.com*

3-дезоксид-Д-арабиногептулозонат-7-фосфат-синтаза (ДАГФ-синтаза) – фермент, катализирующий реакцию конденсации фосфоенолпирувата (ФЕП) и эритрозо-4-фосфата (Э4Ф) с образованием 3-дезоксид-Д-арабиногептулозонат-7-фосфата (ДАГФ). Данная реакция является первым шагом шикиматного пути синтеза хоризмата – предшественника ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина и триптофана), а также целого ряда вторичных метаболитов [1]. Отдельного внимания заслуживают образующиеся в ходе данного метаболического пути феназиновые соединения, проявляющие противомикробную и противораковую активность.

Регуляция потока метаболитов по шикиматному пути осуществляется, главным образом, на уровне модуляции активности ДАГФ-синтаз конечными продуктами данного пути (ароматическими аминокислотами), поддерживая их количество на постоянном уровне. Однако для промышленности и медицины такая регуляция является ограничивающим фактором для получения достаточного количества ряда ценных метаболитов, синтез которых осуществляется через шикиматный путь. Потому целью данной работы является создание генетических конструкций для нокаута генов ДАГФ-синтаз I типа у *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162 [2, 3].

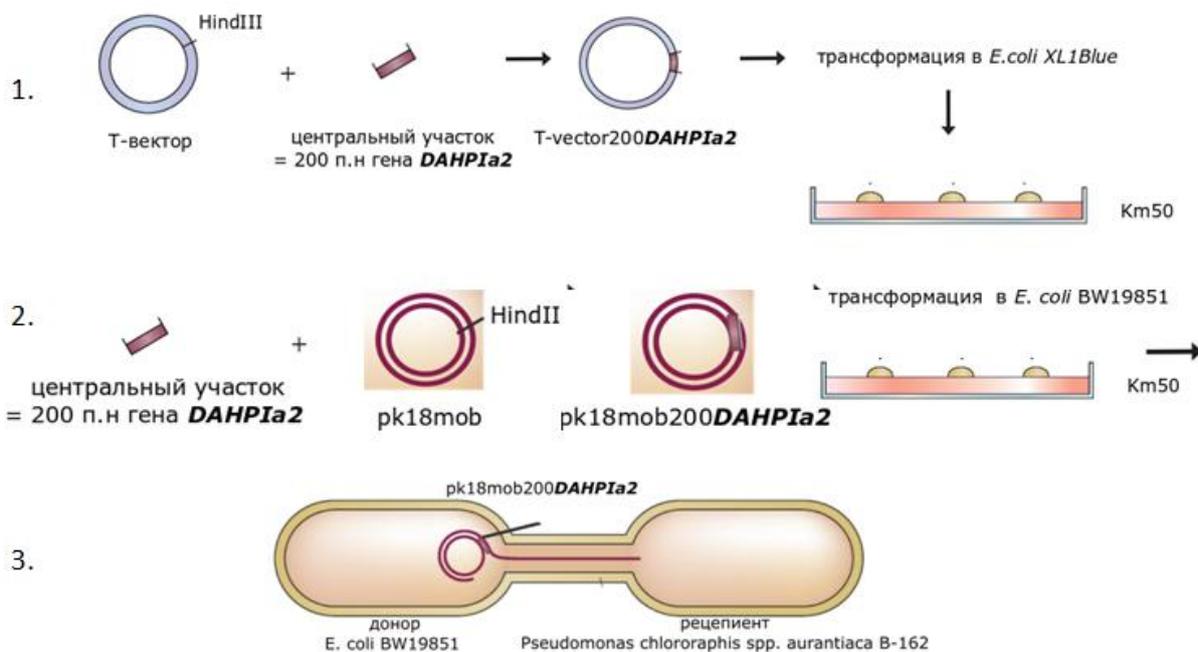
В результате данной работы были созданы генетические конструкции для сайт-направленного инсерционного мутагенеза *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162 с использованием суицидального интегративного вектора pK18mob. Общая схема эксперимента представлена на рисунке 1.

Последовательности праймеров, использованных в данной работе:

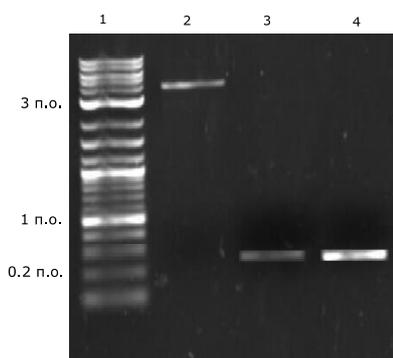
- 1) **cccaagcttatccaccgg gaaatggcca, cccaagcttgctctggcgatcgtagttc** – для амплификации участка 227 *DAHPIα1*,
- 2) **cccaagcttcaactgctgctggacctgg, cccaagctttgatggcaacggctcaggcc** – для амплификации участка 211 *DAHPIα2*.

Как следует из схемы на рисунке 1, на первом этапе было произведено лигирование ПЦР-продуктов центральных участков генов *DAHPIα2* и *DAHPIα1* (размером 277 и 211 п.н., соответственно) с pTZ57R/T вектором. Полученные лигазные смеси, содержащие: 1) pTZ57R/T/227*DAHPIα2*, несущий центральный участок гена *DAHPIα2* и 2) pTZ57R/T/211*DAHPIα1*, несущий центральный участок гена *DAHPIα1* были использованы для трансформации компетентного штамма *E. coli* XL1-Blue. Плазмиды, выделенные из трансформантов,

прошедших селекцию на ампициллине, взятом в концентрации 50 мкг/мл, были проверены на предмет наличия вставки рестрикционным и ПЦР-анализом (рисунок 2).



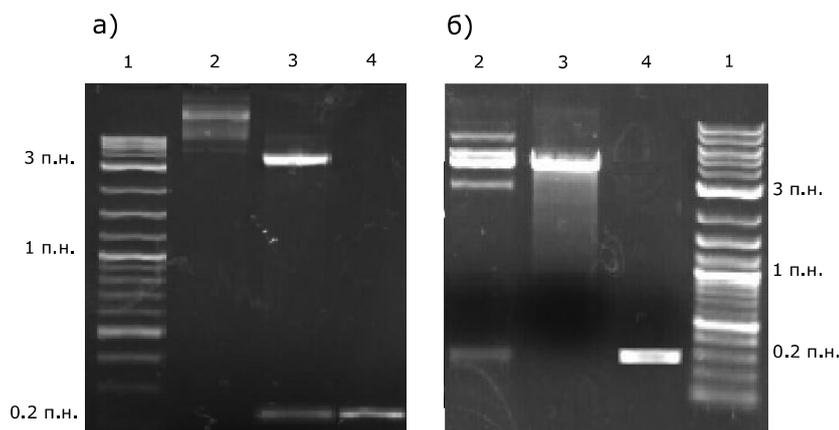
**Рисунок 1** – Схема эксперимента по созданию генетических конструкций для нокаута генов ДАГФ-синтаз I типа у бактерий *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* B-162



1 – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК Long Range 10kb DNA,  
 2 – кольцевая форма плазмиды рTZ57R со вставкой,  
 3 – плазмида рTZ57R со вставкой, обработанная рестриктазой HindIII,  
 4 – ампликон, полученный на рTZ57R со вставкой в качестве матрицы

**Рисунок 2** – Электрофореграмма результатов рестрикционного и ПЦР-анализа на предмет наличия вставок в плазмидах рTZ57R/Т/227**DAHPIa2** и рTZ57R/Т/211**DAHPIa**

На следующем этапе фрагменты *227DAHPIα2* и *211DAHPIα1* были рестрицированы из плазмид *pTZ57R/T/227DAHPIα2* и лигированы с суицидальным вектором *pK18mob*. Клоны, полученные в результате трансформации *E. coli* XL1-Blue лигазными смесями, содержащими 1) *pK18mob/227DAHPIα2* и 2) *pK18mob/227DAHPIα1*, отобранные на канамицине в концентрации 50 мкг/мл, были также проверены на предмет наличия вставки рестрикционным и ПЦР-анализом (рисунок 3).



- 1 – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК Long Range 10kb DNA,  
2 – кольцевая форма плазмиды *pK18mob* со вставкой,  
3 – плазида *pK18mob* со вставкой, обработанная рестриктазой *HindIII*,  
4 – ампликон, полученный на *pK18mob* со вставкой в качестве матрицы

**Рисунок 3** – Электрофореграмма результатов рестрикционного и ПЦР-анализа на предмет наличия вставок в плазидах *pK18mob/227DAHPIα2* (а) и *pK18mob/227DAHPIα1* (б)

Полученные плазмиды были трансформированы в штамм *E. coli* BW19851 для последующего конъюгативного переноса генно-инженерной конструкции в *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162 с целью направленного нокаута генов *DAHPIα2* и *DAHPIα1*.

## Литература

1. Bentley R. The shikimate pathway - a metabolic tree with many branches / R. Bentley // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. – 1990. – Vol. 25. – № 5. – P. 307-384.
2. Dynamic cross-talk among remote binding sites: the molecular basis for unusual synergistic allostery / W. Jiao [et. al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 2012. – Т. 415. – Dynamic cross-talk among remote binding sites. – № 4. – С. 716-726.
3. Light S.H. The diversity of allosteric controls at the gateway to aromatic amino acid biosynthesis / S.H. Light, W.F. Anderson // *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. – 2013. – Vol. 22. – № 4. – P. 395-404.