

СОЗДАНИЕ ВЕКТОРА ИНТЕГРАЦИИ ДЛЯ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS* 2W2

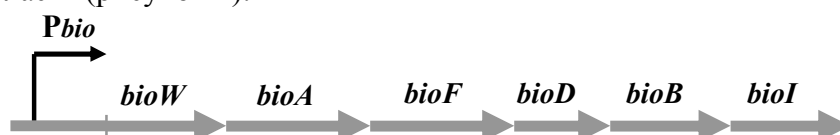
Н.В. Чеписюк

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

**Введение**

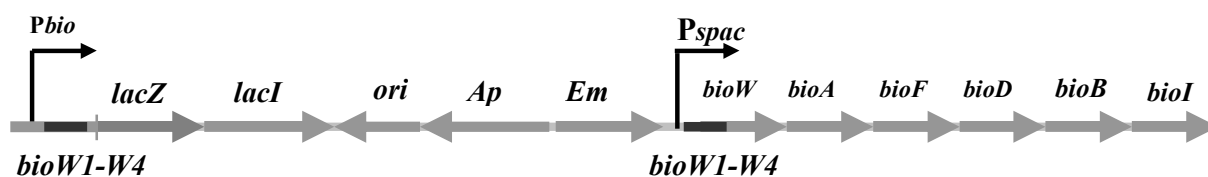
В настоящее время бактерии вида *Bacillus subtilis* широко используются для целенаправленного конструирования штаммов с заданными свойствами. Это обусловлено их генетической изученностью, способностью синтезировать, а также секретировать в окружающую среду широкий спектр различных биологически активных соединений. Неотъемлемым условием успешного изучения функций тех или иных генетических детерминант, а также конструирования штаммов с заданными свойствами является наличие удобных векторных систем молекулярного клонирования. К ним относятся плазмидные вектора, в том числе вектора интеграции. Особенностью вектора интеграции является его неспособность к автономной репликации в клетках бактерий хозяев. Его наследование происходит в составе хромосомы, что обусловлено его встраиванием в хромосому за счет процессов гомологичной рекомбинации между последовательностью ДНК вектора и гомологичной ему областью хромосомальной ДНК [1,2,3,4]. Основными требованиями по отношению к векторам интеграции, предназначенным для использования в клетках *B.subtilis*, является наличие в них маркера антибиотикорезистентности, удобного множественного сайта для клонирования фрагментов ДНК, а также промотора, способного обеспечивать экспрессию генетических детерминант в клетках хозяина. Ранее нами был сконструирован вектор pW2, способный интегрировать в хромосому штамма *B. subtilis*168t в промоторно-операторную область биотинового оперона [5].

Оперон бактерий вида *B.subtilis*, детерминирующий биосинтез биотина (*bio*-оперон), образован шестью структурными генами *bioWAFDBI*, которым предшествует промоторно-операторная область (рисунок 1).

Рисунок 1 – Структура биотинового оперона в клетках бактерий *B. subtilis*

Каждый из структурных генов отвечает за определенный этап последовательного биосинтеза молекулы биотина [6]. Экспрессия генов биотинового оперона регулируется белком – регулятором *BirA*, который в виде двух мономеров способен связываться с операторной областью биотинового оперона. Коферментом белка – регулятора *BirA* является молекула биотина [7]. Таким образом, высокое содержание биотина в клетке приводит к негативной регуляции работы био-промотора.

С помощью вектора pW2 на основе штамма *B. subtilis*168t нами был получен штамм *B.subtilis*2W2 с интеграцией рекомбинантной плазмиды pW2 в промоторно-операторную область биотинового оперона (рисунок 2) [5].

Хромосома *B. subtilis* 2W2Рисунок 2 – Структура локуса биотинового оперона в клетках бактерий *B. subtilis*2W2

Результатом встраивания плазмиды явилось помещение генов биотинового оперона под контроль *spac*-промотора, а маркерного гена *lacZ* под контроль био-промотора. Так как интеграция pW2 произошла за счет одиночной рекомбинации – это привело к полному встраиванию всей последовательности вектора, а также к дупликации последовательности *bioW1-W4*, по которой происходила рекомбинация. Недостатком полученного штамма является наличие в хромосоме упомянутой дублированной последовательности, которая может привести к нестабильности конструкции. Помимо этого в штамме сохраняется негативная регуляция работы био-промотора внутренним биотином клетки, что может оказаться нежелательным при помещении под био-промотор гена синтеза целевого продукта для его дальнейшей наработки.

Основной целью работы являлось создание интегративного вектора, способного к встраиванию в область биотинового оперона бактерий *B.subtilis* 2W2 за счет двойной рекомбинации, предназначенного для удаления одной из копий *bioW1-W4* последовательности, а также делетирования генов биотинового оперона.

#### Методы исследования

Характеристики использованных в работе штаммов бактерий и плазмид представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Штаммы бактерий и плазмиды, использованные в работе

Объект	Описание	Источник /ссылка
<i>E.coli</i> DH5- $\alpha$	F- <i>gyrA96</i> (Nal <sup>r</sup> ) <i>recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i> (rk-mk +) <i>glnV44 deoR</i> $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) <i>U169</i> [ $\phi$ 80d $\Delta$ ( <i>lacZ</i> ) <i>M15</i> ]	[8]
<i>B.subtilis</i> 2W2	Em <sup>r</sup> , LacZ, в область биотинового оперона встроены вектор p2W2	[5]
<i>B.subtilis</i> W6	Cm <sup>r</sup> , LacZ, $\Delta$ bioWAFD,	Данная работа
pBioB	Ap <sup>r</sup> , в вектор pUC18 по <i>Bam</i> HI встроены ген <i>bioB</i>	[9]
pMTL21C	LacZ Cm <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup> , ColE-репликон	[10]
pMB6	Cm <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup> , в вектор pMTL21C по <i>Bam</i> HI встроены ген <i>bioB</i>	Данная работа

Бактериальные культуры выращивали в жидкой полноценной питательной среде, а также на плотной агаризованной питательной среде LB.

Для трансформации бактерий *E. coli* плазмидной ДНК использовали методику кальциевой трансформации [11]. Трансформацию клеток *B. subtilis* проводили согласно рекомендациям, приведенным в работе S. Bron [12].

Выделение тотальной ДНК проводили саркозидовым методом. Выделение плазмидной ДНК осуществляли по стандартной методике щелочного лизиса [11].

Рестрикцию плазмидной ДНК и последующее лигирование фрагментов осуществляли в условиях, рекомендуемых фирмой изготовителем «MBI Fermentas» (Литва). Электрофоретический анализ ДНК осуществляли методами, приведенными в руководстве Маниатис и соавт. [11]. Агарозные гели готовили на основе TAE-буфера с бромистым этидием. Размер фрагментов ДНК устанавливали на основании их электрофоретической подвижности в агарозном геле.

Последовательности праймеров, использованных в работе для амплификации фрагментов ДНК, приведены в таблице 2. В качестве матрицы для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали тотальную ДНК штамма *B.subtilis*W6.

Для определения фенотипического проявления осуществленных генетических модификаций производили высеивание бактериальной культуры штаммов *B.subtilis*W6 и *B. subtilis*168t на минимальную глюкозо-солевую среду Спицайзена [13] с хромогенным субстратом X-gal без биотина, а также с добавлением водного раствора биотина до конечной концентрации 3нг/мл и 300нг/мл.

Таблица 2 – Последовательности праймеров, использованных в работе

Аmplифицируемая последовательность	Нуклеотидные последовательности праймеров
<i>bioB</i>	bioB1 5' - CGGGATCCAAGTGGGGGTATGAGAATGA – 3' bioB2 5' - CGGGATCCAGCTCGCAATGTCTCGTAAA – 3'
<i>Cm</i>	Cm1 5' - CGCGCGGCCGCGAA AAT TGGATAAAGTGGG - 3' Cm 2 5' - CGCGCGGCCGCACCGACTGTAAAAAGTACA - 3'
<i>lacZ</i>	lacZ f 5' - AAGGAGGAAGCACATATGGAAGTTACTGACGTAAGATTAC 3' lacZ r 5' - GACACGCACGAGGTTTATTTTGGACCAGACCAACTG - 3'

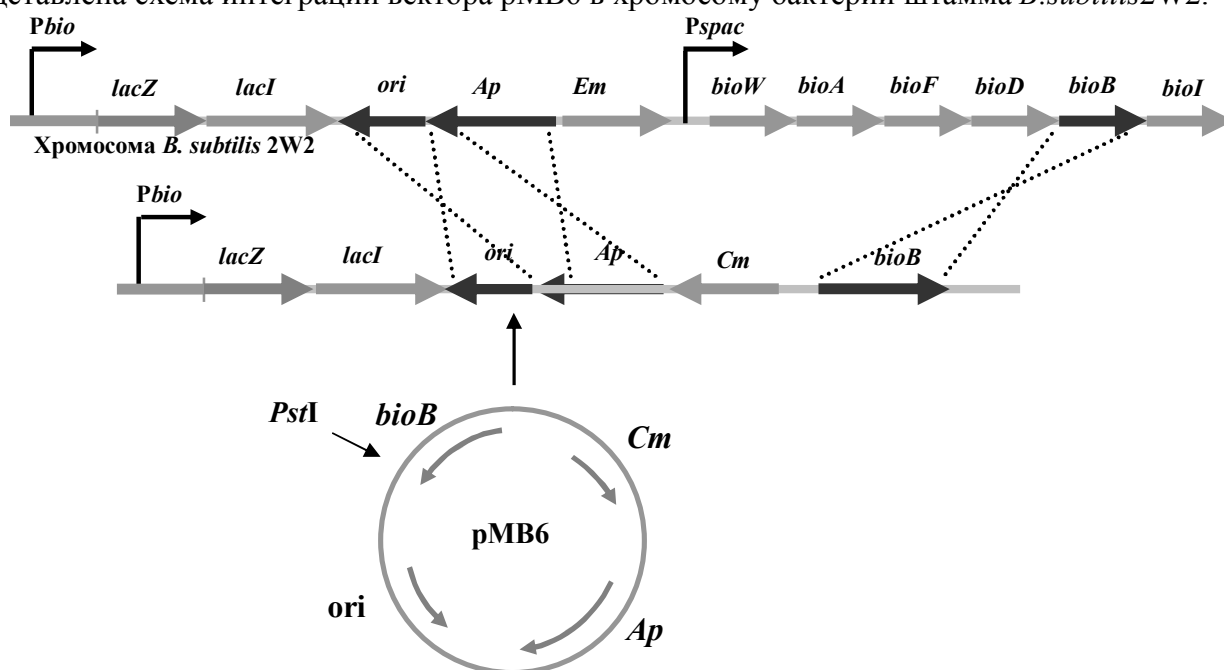
### Результаты и обсуждение

Штамм *B.subtilis*2W2 является производным штамма *B.subtilis*168t, полученным посредством интеграции в промоторно-операторную область биотинового оперона плазмиды pW2. Результатом интеграции (рис. 2) явилась дупликация в хромосоме клонированного в pW2 фрагмента *bioW1-W4*, а также помещение под промотор биотинового оперона маркерного гена *lacZ*, а генов биотинового оперона под контроль индуцируемого ИПТГ *spac*-промотора. Работа *spac*-промотора регулируется геном-регулятором *lacl*, который также входит в состав pW2. При этом работа биотинового промотора, и как следствие, экспрессия *lacZ*, негативно регулируется конечным продуктом биотинового оперона – биотином. Таким образом, в данном штамме осуществляется сложная система регуляции работы промотора биотинового оперона через регуляцию продукции биотина в клетке. Помимо этого pW2 также придает штамму *B.subtilis*2W2 свойство антибиотикорезистентности к эритромицину. Наличие в хромосоме дублированных последовательностей может привести к обратной рекомбинации и, как следствие, нестабильности интегрированной последовательности. С целью стабилизации в хромосоме осуществленной модификации посредством удаления дублированного фрагмента, для удаления лишних гетерологичных последовательностей плазмиды pW2 в хромосоме, а также для снятия регуляции работы биотинового промотора биотином клетки посредством делегирования генов биотинового оперона и обеспечения регуляции работы био-промотора экзогенным биотином, нами была сконструирована плазида для двойной рекомбинации с исследуемой областью хромосомы. Необходимым условием двойной рекомбинации является наличие в составе вектора двух последовательностей, гомологичных хромосоме, разделенных негомологичной последовательностью, а также наличие системы отбора именно двойных рекомбинантов. Так как даже при соблюдении вышеуказанного условия наряду с двойной рекомбинацией, возможна одиночная рекомбинация. При этом первая ведет к интеграции в хромосому области плазмиды между двумя гомологичными последовательностями с исключением аналогичных хромосомальных последовательностей, а вторая к интеграции всей последовательности плазмиды в хромосому.

В качестве основы для получения вектора для рекомбинационной интеграции в область биотинового оперона бактерий штамма *B.subtilis*2W2 использовали плазмиду pMTL21C. Данная плазида содержит *ColE1*-репликон, детерминанты антибиотикорезистентности к ампициллину, способный экспрессироваться в клетках *E.coli* и хлорамфениколу, способный экспрессироваться в клетках *E.coli* и *B. subtilis*. Данный вектор не способен автономно наследоваться в клетках *B. subtilis* и не несет последовательностей, гомологичных биотинному оперону, но несет последовательности, гомологичные последовательностям вектора pW2 искусственно введенным в хромосому *B.subtilis*2W2, посредством его интеграции в промоторно-операторную область биотинового оперона.

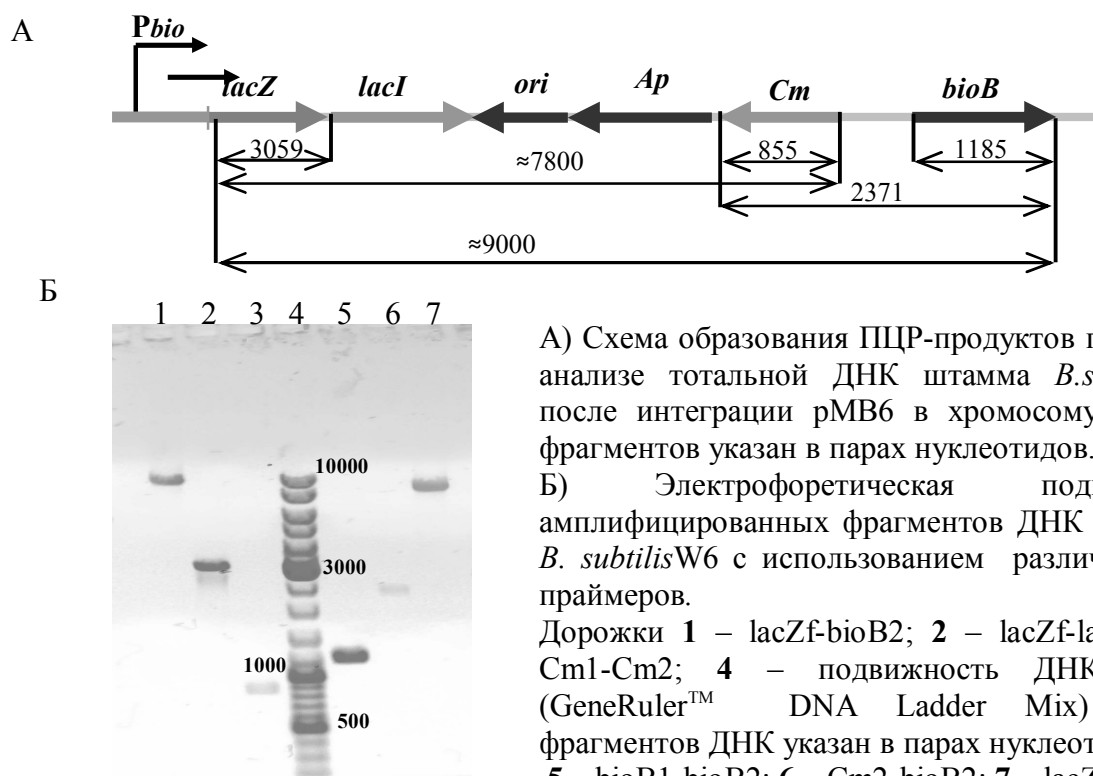
Источником гена *bioB* являлась плазида pBioB, полученная нами ранее [9]. Фрагмент плазмиды, содержащий ген *bioB*, получали посредством обработки плазмидной ДНК ферментом рестрикции *Vam*HI. Вектор pMTL21C также обрабатывали данной рестриктазой. Лигазную смесь рестрицированного вектора и гена *bioB* использовали для трансформации

клеток штамма *E. coli* DH5- $\alpha$ . Выделение плазмидной ДНК с последующим рестрикционным анализом на наличие в составе вектора вставки с правильной ориентацией позволили получить рекомбинантную плазмиду рМВ6. Плазмиду рМВ6 использовали для трансформации штамма *B. subtilis* 2W2. Для перевода в линейаризованную форму рМВ6 перед трансформацией обрабатывали рестриктазой *Pst*I. Трансформантов отбирали на полноценной питательной агаризованной среде с добавлением хлорамфеникола в концентрации 5мкг/мл. Как отмечалось ранее, интеграция рМВ6 в хромосому может произойти как в результате одиночной рекомбинации, так и в случае двойной. При этом клоны обоих типов будут устойчивыми к хлорамфениколу. В случае двойной рекомбинации фрагмент хромосомы, несущий ген устойчивости к эритромицину, будет исключаться, что приведет к проявлению эритромицинчувствительного фенотипа. Это позволяет посредством параллельного отсева клонов по трафарету на чашки Петри с полноценной питательной агаризованной средой с добавлением хлорамфеникола и на чашки с эритромицином отобрать клоны с двойной рекомбинацией рМВ6 с хромосомой. Таким образом был отобран ряд хлорамфениколустойчивых и эритромицинчувствительных клонов. На рисунке 3 представлена схема интеграции вектора рМВ6 в хромосому бактерий штамма *B. subtilis* 2W2.



Возможные области рекомбинации обозначены пунктирной линией  
Рисунок 3 – Схема интеграции рМВ6 в хромосому штамма *B. subtilis* 2W2

Дальнейший анализ клонов проводили с помощью ПЦР-анализа тотальной ДНК, выделенной из отобранных трансформантов. ПЦР-анализ проводили с использованием соответствующих пар праймеров для амплификации различных фрагментов ДНК в пределах исследуемого участка хромосомальной ДНК. На рисунке 4а отражена схема амплифицированных фрагментов ДНК с указанием их размеров, а также приведена электрофореграмма продуктов ПЦР-реакции. Размер полученных экспериментально продуктов ПЦР-реакции полностью соответствовал теоретически ожидаемому, при условии встраивания рМВ6 в хромосому за счет двойной рекомбинации, что привело к делетированию в хромосоме части последовательности рW2 и генов *bioWAFD* биотинового оперона. Штамм, полученный на основе *B. subtilis* 2W2 посредством интеграции в его хромосому вектора рМВ6, обозначили как *B. subtilis* W6.



А) Схема образования ПЦР-продуктов при ПЦР-анализе тотальной ДНК штамма *B. subtilis*W6 после интеграции рМВ6 в хромосому. Размер фрагментов указан в парах нуклеотидов.

Б) Электрофоретическая подвижность амплифицированных фрагментов ДНК бактерий *B. subtilis*W6 с использованием различных пар праймеров.

Дорожки 1 – lacZf-bioB2; 2 – lacZf-lacZr; 3 – Cm1-Cm2; 4 – подвижность ДНК-маркера (GeneRuler™ DNA Ladder Mix) размер фрагментов ДНК указан в парах нуклеотидов; 5 – bioB1-bioB2; 6 – Cm2-bioB2; 7 – lacZf-Cm1

Рисунок 4

На следующем этапе работы изучали фенотипическое проявление полученных генетических модификаций в области биотинового оперона. Для этого штамм *B. subtilis*W6 высевали на минимальную глюкозо-солевую среду Спицайзена с добавлением хромогенного субстрата X-gal с различным содержанием биотина: 3нг/мл, 300нг/мл и без добавления биотина. При изучении особенностей окраски колоний на различных чашках было выявлено следующее: на чашке с содержанием биотина 300нг/мл колонии имели белую окраску. На чашках с биотином концентрацией 3нг/мл - голубую окраску, а на чашке без добавления биотина отмечалась синяя окраска колоний, размер которых был значительно меньше, чем на двух вышеупомянутых чашках. Колонии штамма *B. subtilis*168t, не несущие в хромосоме гена *lacZ*, на всех чашках имели белую окраску. Особенности окраски колоний на различных чашках могут быть объяснены следующим образом: биотина в концентрации 300нг/мл в среде достаточно для роста штамма *B. subtilis*W6, а также для полной репрессии био-промотора, что ведет к тому, что *lacZ* не экспрессируется и колонии не окрашиваются. Биотина в концентрации 3нг/мл в среде достаточно для роста штамма, но не достаточно для полной репрессии био-промотора, вследствие чего осуществляется экспрессия *lacZ* и колонии окрашены в голубой цвет. Синяя окраска колоний на чашках без добавления биотина может быть обусловлена тем, что незначительного количества примесей биотина в минимальной среде достаточно для роста штамма с делетированными генами биотинового оперона, но данный биотин среды не оказывает негативной регуляции био-промотора. Вследствие этого ген *lacZ* экспрессируется, что придает колониям синюю окраску. Помимо этого, многократное пересев бактерий штамма *B. subtilis*W6 на полноценной питательной среде без хлорамфеникола с последующим высевом на среду с антибиотиком не выявило утраты интегрированной конструкции при росте без селективного агента, что может свидетельствовать о ее стабильном наследовании в составе хромосомы.

Таким образом, в результате работы был создан вектор интеграции рМВ6, способный встраиваться в хромосому штамма *B. subtilis*2W2 за счет двойной рекомбинации. Его интеграция приводит к делеции генов биотинового оперона *bioWAFD*. На основе штамма *B. subtilis*2W2 с помощью вектора рМВ6 получен рекомбинантный штамм *B. subtilis*W6. Для

данного штамма показано стабильное наследование интегрированной конструкции, а также регуляция работы био-промотора посредством добавления в среду культивирования бактерий экзогенного биотина.

### Список литературы

1. Duncan, C. Mechanism of integrating foreign DNA during transformation of *Bacillus subtilis* / C. Duncan, G. A. Wilson, F. E. Young // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1978. – V.75 – P.3664–3668.
2. Haldenwang, W. G. Mapping a Cloned Gene Under Sporulation Control by Insertion of a Drug-Resistance Marker into the *Bacillus subtilis* Chromosome / W. G. Haldenwang, C. D. B. Banner, J. F. Ollington, R. Losick, J. A. Hoch, M. B. O'Connor, A. L. Sonenshein // J. Bacteriol. – 1980. – V.142 – P.90–98.
3. Vagner, V. A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis* / V. Vagner, E. Dervyn, S. D. Ehrlich // Microbiology-UK – 1998 – V.144 – P.3097–3104.
4. Vagner, M. The mechanism of insertion of a segment of heterologous DNA into the chromosome of *Bacillus subtilis* / M. Vagner // J. Gen. Microbiol. – 1983. – V.129 – P.1497–1512.
5. Чеписюк, Н.В. Замена природного промотора биотинового оперона бактерий *Bacillus subtilis* 168t на *spac*-промотор / Н.В. Чеписюк, В.А. Прокулевич // Труды БГУ. – 2009. – Т.143. – №2 – С. 158 – 163.
6. Bower, S. Cloning, sequencing, and characterization of the *Bacillus subtilis* biotin biosynthetic operon / S. Bower, J. Perkins, R. R. Yocum, C. L. Howitt, P. Rahaim, J. Pero // J. Bacteriol. – 1996. – Vol. 178 – P. 4122–4130.
7. Bower, S. Cloning and characterization of the *Bacillus subtilis* *birA* gene encoding a repressor of the biotin operon / S. Bower, J. Perkins, R. R. Yocum, P. Serror, A. Sorokin, P. Rahaim, C. L. Howitt, N. Prasad, S. D. Ehrlich., J. Pero // Bacteriol. – 1995. – Vol. 177 – P. 2572–2575.
8. Bullock, W.O. XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection / W.O. Bullock, J.M. Fernandez, J.M. Stuart // Bio. Technology. – 1987. – Vol.5 – P. 376–379.
9. Чеписюк, Н.В. Направленный инсерционный мутагенез структурных генов биотинового оперона у бактерий вида *Bacillus subtilis* / Н.В.Чеписюк, В.А. Прокулевич // Вест. Белорус. гос. ун-та. Сер. 2, Химия. Биология. География. – 2008. – № 3. – С. 50–54.
10. Chambers, S.P. The pMTL *nic*-cloning vectors. I. Improved pUC polylinker regions to facilitate the use of sonicated DNA for nucleotide sequencing / S.P. Chambers, S.E. Prior, D.A. Barstow, N.P. Minton // Gene. – 1988. – Vol. 68, № 1. – P. 139–149.
11. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / – Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 480с.
12. Bron, S. Plasmids / – Molecular Biological Methods for *Bacillus*. Ed. Harwood C.R. - John Wiley and Sons Ltd, Chichester. – 1990. – P.75–174.
13. Anagnostopoulos C., Requirements for transformation in *Bacillus subtilis* / C. Anagnostopoulos, J. Spizizen // J. Bacteriol. – 1961. – Vol. 81, № 5. – P. 741–746.

## CONSTRUCTION OF INTEGRATION VECTOR FOR THE BACTERIA *BACILLUS SUBTILIS*2W2

N.V. Chepisiuk

*Belarusian State University, Minsk, Belarus*

A new integration vector pMB6 capable of integration into the chromosome of *B.subtilis*2W2 by means of double recombination was constructed. Its integration leads to the deletion of biotin-biosynthetic genes *bioWAFD*. On the base of *B.subtilis*2W2 a recombinant strain *B.subtilis*W6 has been constructed by means of pMB6. Stable inheritance of the construction was shown for the strain, as well as that bio-promoter is controlled by exogenous biotin.