

тогда как после обработки ингибитором тирозинфосфатазы (ортованадатом натрия) кортикальные МТ становились более устойчивыми к действию низкой температуры по сравнению с контролем.

It was found that treatment of *Arabidopsis thaliana* (GFP-MAP4) seedlings with tyrosine kinase inhibitor (herbimycin A) significantly increase the cortical microtubules (MTs) sensitivity of the root cells to cold, whereas after treatment with inhibitor of tyrosine phosphatase (sodium orthovanadate) cortical MTs become more resistant to low temperature exposure as compared to control.

**ШЛЯХОТКО Е.А.¹, САПУНОВА Л.И.¹, ЛОБАНОК А.Г.¹, ЕВТУШЕНКОВ А.Н.²,
ВЫГОВСКАЯ О.Н.²**

¹ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», Беларусь, 220141, Минск,
ул. В.Ф.Купревича, 2, тел.: + (37517) 267-62-09, факс: + (37517) 267-47-66,
e-mail: leonida@mbio.bas-net.by

²Белорусский государственный университет, Беларусь, 220050, Минск,
пр-кт Независимости, 4, e-mail: evtushenkov@bsu.by

КОНСТРУИРОВАНИЕ ГИБРИДНОГО ВЕКТОРА ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ ГЕНА ХУЛА В БАКТЕРИЯХ РОДА *ARTHROBACTER*

Широкое практическое использование бактерий родов *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium* и *Mycobacterium* в микробиологической промышленности обусловлено необычайно разнообразным спектром продуцируемых ими метаболитов. Повышение продуктивности имеющихся и создание новых производственных штаммов – одно из необходимых условий развития и поддержания рентабельности существующих и создания современных биотехнологий, в основе которых лежит микробный синтез. Благодаря достигнутому в последние десятилетия успехам молекулярной биологии, при создании штаммов-суперпродуцентов коммерчески востребованных продуктов на смену традиционным генетическим методам приходят технологии рекомбинантных ДНК, или генной инженерии.

Генно-инженерное изменение наследственных свойств организма является результатом конструирования из различных фрагментов нового генетического материала, введения его в реципиентный организм и создания условий для стабильного наследования и функционирования генетических конструкций. В настоящее время большинство векторных молекул для клонирования и экспрессии генов, а также методик введения генетического материала в компетентные клетки разработано для манипуляций с грамотрицательными микроорганизмами, в частности, с различными штаммами бактерий *Escherichia coli*. Как правило, указанные генетические конструкции и методические приемы не предназначены для работ с грамположительными организмами, в том числе и с актинобактериями рода *Arthrobacter*. Создание векторов для клонирования генов в указанной группе микроорганизмов позволит конструировать на их основе новые высокоактивные штаммы-продуценты коммерчески востребованных продуктов.

Ранее нами был отобран штамм *Arthrobacter nicotianae* БИМ В-5-МГ-1, характеризующийся высоким уровнем синтеза ксилозиомеразы (D-ксилоза кетол-изомераза, КФ 5.3.1.5) [1]. Фермент предназначен для промышленного производства натуральных подсластителей – глюкозо-фруктозных сиропов и кристаллической фруктозы из осахаренного крахмала [2].

Для конструирования рекомбинантного штамма-продуцента ксилозиомеразы на основе бактерий рода *Arthrobacter* необходимо создание векторных систем для

прямого клонирования генов и их эффективной экспрессии в указанной группе микроорганизмов, что является целью данной работы.

Материалы и методы

Бактерии выращивали глубинно в 250 мл колбах Эрленмейера при 28⁰С (бактерии рода *Arthrobacter*), 30⁰С (*Corynebacterium glutamicum*) и 37⁰С (*Escherichia coli*) в течение соответственно 72, 30 и 24 ч на питательной среде Лурия-Бертани (LB-среде), содержащей (в г/л): пептон – 10,0, дрожжевой экстракт – 5,0, NaCl – 10,0. При выращивании рекомбинантных штаммов указанная среда дополнительно включала антибиотик, соответствующий селективному маркеру резидентной плазмиды, – канамицин, тиострептон или ампициллин в количестве соответственно 0,02, 0,05 или 0,1 г/л.

Посевным материалом служила суспензия 16-18-часовой культуры исследуемых бактерий, выращенной на жидкой LB-среде, в количестве 1 об. %.

Выделение ДНК плазмид из клеток *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Arthrobacter citreus* проводили согласно протоколам [3-5]. Рестрикцию и лигирование ДНК осуществляли общепринятыми методами [6]. В работе использовали ферментные препараты «Fermentas» (Литва).

Выделение и очистку фрагментов ДНК проводили в соответствии с инструкцией производителя набора «Fermentas» (Литва), трансформацию бактерий рода *Arthrobacter* – согласно [5].

Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК осуществляли общепринятым методом в 1%-ном агарозном геле.

Результаты и обсуждение

Важной предпосылкой успешного клонирования генов является использование генетических конструкций, которые содержат репликон, ведущий свое происхождение от резидентной плазмиды модифицируемого организма. Согласно результатам выполненных нами исследований, резидентные плазмиды в клетках одиннадцати различных штаммов рода *Arthrobacter*, хранящихся в Белорусской коллекции непатогенных бактерий, не выявляются. Анализ данных литературы показал, что специальные векторы для клонирования и экспрессии генов в бактериях рода *Arthrobacter* в настоящее время также отсутствуют. Принимая во внимание вышеизложенное, одним из решений проблемы введения генетического материала в актинобактерии рода *Arthrobacter* является использования известных генетических конструкций, которые предназначены для трансформации близкородственных видов и родов. Успешное клонирование генов в бактериях рода *Arthrobacter* осуществлено в составе векторов, сконструированных для *Brevibacterium lactofermentum*, *Corynebacterium glutamicum* и *Streptomyces lividans* [5, 7].

Поэтому нами была изучена возможность экспрессии векторов, созданных для вышеуказанных организмов, в клетках *Arthrobacter nicotianae*. Трансформацию бактерий *A. nicotianae* осуществляли векторами *pHY416* (*C. glutamicum* – *Bacillus subtilis*), *pHAG6* (*C. glutamicum*) и *pIJ702* (*Streptomyces lividans*) по методике, описанной в [5] с модификациями. А именно: при получении протопластов Р-буфер заменяли 1 М фосфатным буфером (рН 8,0), содержащим 10,3 % сахарозы, а инкубацию клеток с лизоцимом (5 мг/мл) проводили при комнатной температуре без периодического перемешивания.

В результате проведенных исследований было установлено, что клоны, выросшие из подвергнутых трансформации протопластов бактерий *A. nicotianae*, приобретали устойчивость к канамицину или тиострептону, обусловленную соответственно векторами *pHY416* и *pHAG6* или *pIJ702*.

Результаты определения частоты образования трансформантов *A. nicotianae* в условиях опыта представлены в табл. 1.

Частота образования гибридных клонов при трансформации *A. nicotianae* различными векторами

Вектор	Частота образования гибридных клонов, клеток/мкг ДНК
<i>pHY416</i>	$10^4 - 10^5$
<i>pHAG6</i>	$10^2 - 10^3$
<i>pIJ702</i>	$10 - 10^2$

Как видно из представленных данных, наиболее подходящей для трансформации актинобактерий *A. nicotianae* оказалась плазмида *pHY416*, отобранная нами для дальнейшей работы по клонированию гена ксилосоизомеразы в клетках актинобактерий рода *Arthrobacter*. Указанный вектор размером 9,3 т.п.н. несет маркер устойчивости к канамицину и представляет собой гибридную молекулу ДНК, включающую резидентную плазмиду *pSRI* бактерий *Corynebacter glutamicum* и вектор *pBD10* *Bacillus subtilis*.

Для конструирования гибридной плазмиды *pHY416xylA*, наследующей ген ксилосоизомеразы *A. nicotianae*, в вектор *pHY416* встраивали ген *xylA*, находящийся в полученной ранее гибридной плазмиде *pUC18xylA* [8]. С этой целью векторы *pHY416* и *pUC18xylA* подвергали рестрикции соответственно ферментами *ScaI* и *SmaI*, рестрикционные смеси разделяли в агарозном геле, полученные фрагменты очищали адсорбцией на пористом стекле. Результаты электрофоретического анализа полученных фрагментов ДНК *pHY416/ScaI* и *xylA/SmaI* представлены на рис. 1.

Для увеличения выхода гибридных конструкций при лигировании, проводимом в течение 2 ч при комнатной температуре, фрагмент *xylA/SmaI* был представлен в 5-кратном избытке по отношению к фрагменту *pHY416/ScaI*. Отбор клонов, полученных в результате трансформации протопластов дефицитного по ксилосоизомеразе штамма *A. citreus*, проводили на полноценной среде с канамицином. Для контроля жизнеспособности протопласты высевали на полноценную среду без канамицина.

Рестрикционный анализ плазмидной ДНК, выделенной из клеток *A. citreus*, растущих на среде с канамицином и продуцирующих ксилосоизомеразу, подтвердил наличие в составе вектора *pHY416* вставочного фрагмента, содержащего ген *xylA* (рис. 2). Карта гибридной плазмиды *pHY416xylA* представлена на рис. 3.

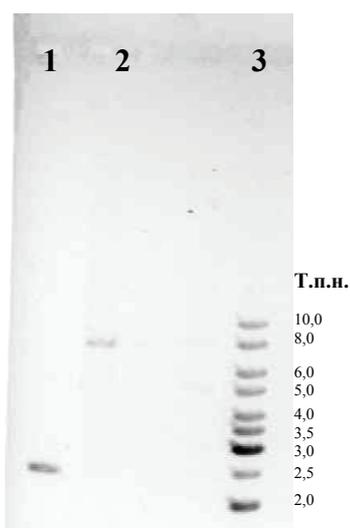


Рисунок 1

Электрофореграмма очищенных фрагментов ДНК:
1 – *pHY416/ScaI*, 2 – *xylA/SmaI*,
3 – молекулярный маркер

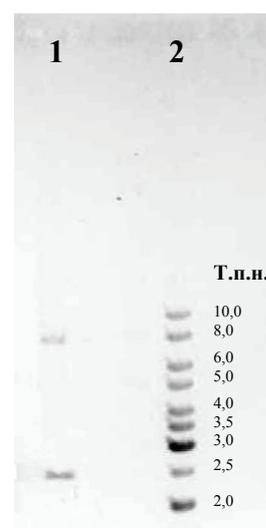


Рисунок 2

Электрофореграмма фрагментов рестрикции гибридной плазмиды *pHY416xylA* (1). Молекулярный маркер (2)

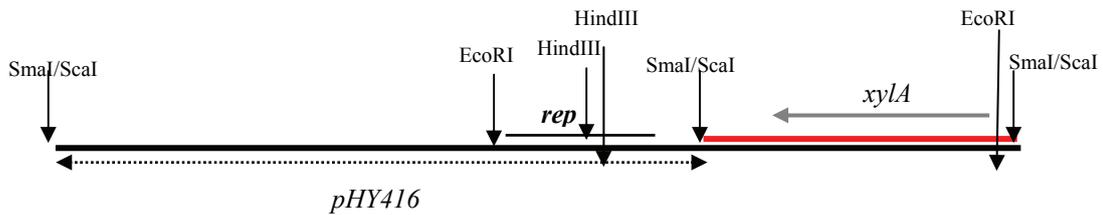


Рисунок 3
Карта гибридной плазмиды *pHY416xylA*

Заключение. Поиск резидентных плазмид в клетках одиннадцати различных штаммов бактерий рода *Arthrobacter*, предпринятый с целью конструирования вектора для клонирования генов в указанной группе микроорганизмов, не дал результата. Применение для трансформации *A. nicotianae* генетических конструкций близкородственных видов показало, что наибольшее число гибридных клонов (10^4 - 10^5 клеток/мкг ДНК) образуется при трансформации протопластов *A. nicotianae* вектором *pHY416*, созданным для клонирования в клетках *Corynebacterium glutamicum*. Сконструирована и использована для трансформации *Arthrobacter citreus* (*xylI*) гибридная плаزمида *pHY416xylA*, наследующая ген ксилозоизомеразы *A. nicotianae*. Полученный трансформант *A. citreus* характеризуется устойчивостью к канамицину и способностью к синтезу ферментного белка, обусловленными экспрессией указанного вектора в клетках бактерий.

Литература

1. Lobanok A.G., Sapunova L.I., Dikhtievski Ya.O., Kazakevich I.O. // World J. Microbiol. Biotechnol. – 1998. – Vol. 14, № 2. – P. 259–262.
2. Bhosale S.H., Rao M.B., Deshpande V.V. // Microbiol. Rev. – 1996. – Vol. 60, № 2. – P. 280–300.
3. Birnboim H.G., Doly G. // Nucleic Acids Res. – 1979. – 7. – P. 1513–1523.
4. Manual of industrial microbiology and biotechnology / ed. Demain A.L., Davies J.E. ... [et al]. – Washington. – 1999. – P. 830.
5. Roberts A.N., Barnet L., Brenner S. // Biochem J. – 1987. – Vol. 243. – P. 431–436.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. – М.: Мир. – 1984. – 479 с.
7. Shaw P.C., Hartley B.S. // J Gen Microbiol. – 1988. – Vol. 134, № 4. – P. 903–911
8. Шляхотко Е.А., Сапунова Л.И., Лобанок А.Г., Евтушенко А.Н. // Доклады НАН Беларуси. – 2006. – Т. 50, № 3. – С. 73–76.

Резюме

Сконструирована гибридная плазмида *pHY416xylA* с геном *xylA* *Arthrobacter nicotianae*. Трансформированный вектором *pHY416xylA* штамм *Arthrobacter citreus* (*xylI*) приобрел устойчивость к канамицину и способность к продукции ксилозоизомеразы.

Сконструйована гібридна плазмідна *pHY416xylA* з геном *xylA* *Arthrobacter nicotianae*. Трансформований вектором *pHY416xylA* штама *Arthrobacter citreus* (*xylI*) набував стійкість до канамицину і здатність до продукції ксилозоізомерази.

Hybrid plasmid *pHY416xylA* carrying gene *xylA* of *Arthrobacter nicotianae* was designed. *Arthrobacter citreus* (*xylI*) after transformation by such plasmid became canamycin resistant and xylose isomerase positive.