

УДК 579.841

РАЗРАБОТКА ОБЩЕЙ КОНЦЕПЦИИ РЕГУЛИРУЕМОЙ ИНАКТИВАЦИИ ГЕНА ШИКИМАТКИНАЗЫ ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ ШИКИМАТНОГО ПУТИ У БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS*

ЮЙ ЧАО¹⁾, М. Ю. ШОНИНА¹⁾, А. В. ЛАГОДИЧ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

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. На основе метода полимеразной цепной реакции разработана система для быстрого скрининга трансформантов на наличие рекомбинационных перестроек генома и интегративной конструкции в составе бактериальной хромосомы трансформированного штамма.

Ключевые слова: трансформация; интеграция; инактивация; шикимовая кислота; шикиматкиназа; ПЦР-скрининг; *Bacillus subtilis*.

DESIGN OF THE GENERAL CONCEPT OF REGULATED INACTIVATION OF THE GENE SHIKIMATKINASE FOR MODIFICATION OF THE SHIKIMAT WAY IN BACTERIA *BACILLUS SUBTILIS*

Yu CHAO^a, M. Y. SHONINA^a, A. V. LAHODZICH^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: A. V. Lahodzich (lagodichav@bsu.by)

In this work demonstrated the possibility of the transformation strains of *B. subtilis* used to create strains-producers of shikimic acid. For 6 strains of *B. subtilis*, with the ability to increased synthesis of tryptophan, produced amplicons region of the genome containing genes *tmrB* and *aroI*. RFLP-analysis of the received amplicons showed their genetic polymorphism, which may be the result of mutagenesis used when receiving strains-producers of tryptophan. Based on the PCR method designed a system for fast screening of transformants for the presence of recombination and genome rearrangements presence integrative structure comprising bacterial strains used chromosomes from transformants.

Key words: transformation; integration; inactivation; shikimic acid; shikimatkinase; PCR-screening; *Bacillus subtilis*.

Образец цитирования:

Юй Чао, Шонина М. Ю., Лагодич А. В. Разработка общей концепции регулируемой инактивации гена шикиматкиназы для модификации шикиматного пути у бактерий *Bacillus subtilis* // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 3. С. 45–53.

For citation:

Yu Chao, Shonina M. Y., Lahodzich A. V. Design of the general concept of regulated inactivation of the gene shikimatkinase for modification of the shikimat way in bacteria *Bacillus subtilis*. J. Belarus. State Univ. Biol. 2017. No. 3. P. 45–53 (in Russ.).

Авторы:

Юй Чао – аспирант кафедры генетики биологического факультета. Научный руководитель – А. В. Лагодич.
Мария Юрьевна Шонина – аспирантка кафедры генетики биологического факультета. Научный руководитель – А. В. Лагодич.
Алексей Викторович Лагодич – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры генетики биологического факультета.

Authors:

Yu Chao, postgraduate student at the department of genetics, faculty of biology.
cygoodluck1989@gmail.com
Maria Y. Shonina, postgraduate student at the department of genetics, faculty of biology.
shonina89@gmail.com
Aliaksei V. Lahodzich, PhD (biology), docent; associate professor at the department of genetics, faculty of biology.
lagodichav@bsu.by

Введение

Создание новых безопасных, малотоксичных, низкодозных и в то же время весьма эффективных медицинских препаратов на основе доступного сырья – одна из главных задач современной фармацевтической и медицинской химии [1]. По этой причине весьма целесообразными являются поиск альтернативных источников этого сырья и модификация существующих способов его получения.

Шикимовая кислота, благодаря своим хиральным свойствам, находит широкое применение в фармацевтической и косметической промышленности и служит ключевым соединением, используемым при синтезе ряда препаратов, применяемых для лечения и профилактики заболеваний, вызываемых штаммами вируса гриппа [2–4]. На основе шикимовой кислоты синтезируются вещества, активно используемые при химиотерапии раковых заболеваний [1]. Производные шикимовой кислоты – монопальмитилоксишикимовая и триацетилшикимовая кислоты – обладают антикоагулянтной и антитромботической активностью и снижают свертываемость крови при внутримышечном введении [5].

У растений и микроорганизмов шикимовая кислота является 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 [6; 7], поэтому многие ее производные представляют интерес для сельского хозяйства и используются в качестве гербицидов и антибактериальных средств. Их применение основано на способности блокировать шикиматный путь у организмов указанных систематических групп без негативного эффекта для млекопитающих и человека [8].

Высокая востребованность шикимовой кислоты для получения различных медицинских препаратов, а также наличие широкого круга потенциальных областей применения обуславливают постоянный поиск и апробацию различных способов ее получения [9].

Цель настоящей работы – изучение возможности модификации шикиматного пути у бактериальных штаммов *B. subtilis*, обладающих способностью к повышенному синтезу триптофана, и разработка стратегии для получения на их основе продуцентов шикимовой кислоты.

Материалы и методы исследований

Бактериальные штаммы и плазмиды. В работе использовали бактериальные штаммы – *E. coli* DH5a [10] и XL-1 Blue [11], типовой штамм *B. subtilis* – 168 trpC2 [12], штаммы из коллекции кафедры генетики биологического факультета БГУ, характеризующиеся повышенным уровнем синтеза триптофана, – *B. subtilis* КМБУ 2003, *B. subtilis* ВКПМ 5434, *B. subtilis* ВНИИ Генетика-15 [13] и производные последнего – C10, D3 и D4, полученные путем ступенчатого мутагенеза данного штамма и последующего отбора мутантов, резистентных к структурным аналогам триптофана (уровень продукции L-триптофана составляет 10–12 г/л), плазмиды pLAV1, pAL1 и pAL2 [14].

Среды и реактивы. Бактериальные культуры выращивали в жидких и на плотных питательных средах различного состава LB [15] либо в минимальной среде Spizizen [12]. Агаризованные среды содержали 1,5 % агара, источником углерода служила глюкоза в конечной концентрации 0,2 % (для бактерий *E. coli*) и 0,5 % (для *B. subtilis*). Аминокислоты, основания и витамины добавляли в концентрации 20; 10 и 1 мкг/мл соответственно.

В работе использовали коммерческие препараты антибиотиков «Хлорамфеникол» в концентрации 5–15 мкг/мл и «Ампициллин» в концентрации 50–100 мкг/мл (ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов», Беларусь). Препарат «Ампициллин» растворяли в стерильной воде, «Хлорамфеникол» – в 96 % этиловом спирте. IPTG и б-галактозидазу (*Thermo Fisher Scientific*, Литва) готовили в соответствии с рекомендациями изготовителя и использовали в концентрации 500 ммоль/л и 50 мкг/мл соответственно.

Методы исследований. Рестрикцию ДНК осуществляли в условиях, рекомендуемых изготовителями ферментов (*Thermo Fisher Scientific*, Литва, и *Jena Bioscience*, Германия). В качестве реперной ДНК при определении размеров рестрикционных фрагментов использовали синтетические реперы: DNA Ladder Mix (*Thermo Fisher Scientific*, Литва) и 1 kb ДНК-репер («Праймтех», Беларусь). Для определения концентрации препаратов ДНК использовали Lambda DNA/HindIII Marker, 2 либо Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker, 3 (*Thermo Fisher Scientific*, Литва).

Плазмидную ДНК из бактерий *E. coli* и *B. subtilis* выделяли методом щелочного лизиса [16], для получения препарата плазмид из клеток бактерий *B. subtilis* культуру плазмидсодержащих 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 [15] и работах [12; 21]. Трансформацию штаммов *B. subtilis*, обладающих повышенным уровнем синтеза триптофана, выполняли по модифицированной методике, для чего использовали 100–150 нг плазмидной ДНК.

При постановке полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали набор реактивов производства «Праймтех» (Беларусь) либо набор реактивов *Thermo Fisher Scientific* (Литва) и амплификаторы производства *Thermo Hybaid* (США) и *Life Pro Thermal Cycler Bioer Serves Life* (Китай). Фрагмент бактериальной хромосомы *B. subtilis*, содержащий гены *tmrB* и *aroI*, амплифицировали с помощью двух пар альтернативных праймеров. Для пары ShikF-NotI и ShikR-BamHI применяли следующие режимы амплификации: 94 °C, выдержка – 5 мин (один цикл); 94 °C – 30 с, 52 °C – 30 с, 68 °C – 2 мин (10 циклов); 94 °C – 30 с, 54 °C – 30 с, 68 °C – 2 мин (20 циклов); 72 °C – 10 мин. Праймеры содержали на 5'-концах сайты для рестриктаз NotI и BamHI соответственно.

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

Таблица 1

Характеристика праймеров, используемых для амплификации фрагмента бактериальной хромосомы *B. subtilis*, содержащего гены *tmrB* и *aroI*

Table 1

Characterization of primers used to amplify a fragment of the *B. subtilis* bacterial chromosome containing the genes *tmrB* and *aroI*

Название праймера	Последовательность 5'–3'	Температура плавления (T_m), °C	Доля GC, %
ShikF-NotI	<u>GCGGCC</u> <u>GCC</u> ATT AGT GTA AAG TGG TGA AC	53/61/52 (64/73/64)	43 (55)
ShikR-BamHI	ccGGAT <u>CCG</u> CCC AGA GAT ACG ATT TTG	54/61/55 (63/71/63)	52 (56)
ShikF1-EcoRI	gGAATTC <u>CGG</u> TAT GTA TCT GTC AGA GAA G	53/60/52 (60/69/59)	45 (45)
ShikR2-SacII	cCCGCG <u>GGC</u> CAC TTT TGA ATT GTG CTT GT	53/61/55 (60/69/59)	43 (45)

Примечание. В последовательности праймеров использованы следующие обозначения: подчеркивание – сайт распознавания рестриктазы; полужирный шрифт с разбивкой на триплеты – комплементарные участки области первичной посадки праймера; строчные буквы – 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 программные возможности интернет-ресурсов: *Олигокалькулятор* (<http://www.bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html>), *BLASTP2.2.1* и *Gene Bank* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Химический синтез праймеров производился компанией «Праймтех» (Беларусь).

Результаты исследований и их обсуждение

Перспективность использования бактерий *B. subtilis* для получения шикимовой кислоты объясняется рядом свойств, уже позволивших им найти широкое применение в различных отраслях биотехнологического производства [17]. Бактерии *B. subtilis* традиционно используются в микробиологической и пищевой промышленности, они безопасны с точки зрения экологических требований и имеют статус GRAS (generally regarded as safe), хорошо изучены в генетическом отношении [18; 19].

Основные методы получения штаммов – продуцентов *B. subtilis* разделяются, во-первых, по способу получения рекомбинантных бактерий – векторные молекулы могут вводиться за счет трансформации (электропорации) или путем слияния протопластов; во-вторых, по способу поддержания и локализации генетического материала – за счет клонирования в составе плазмидного вектора или интеграции в хромосому. При этом конечный продукт может накапливаться внутриклеточно или секретироваться во внешнюю среду. Но независимо от способа получения штамма, локализации детерминант, определяющих его важнейшие коммерческие свойства, существуют универсальные правила, используемые при конструировании продуцентов. В рамках молекулярно-генетических технологий они

могут быть сведены к выполнению ряда принципов, заключающихся в повышении числа транскрипционных раундов кодирующего материала, которое может быть достигнуто увеличением количества копий транскрибируемого гена, снятием репрессии на определенном уровне, постановкой целевого гена под более сильный промотор и блокированием применения целевого продукта в дальнейших метаболических путях. Все эти приемы могут быть использованы и реализованы с применением векторных конструкций.

Существующие штаммы – продуценты шикимовой кислоты, созданные на основе бактерий *B. subtilis*, были получены путем увеличения числа копий генов, кодирующих шикиматдегидрогеназу, и ингибирования генов, отвечающих за синтез шикиматкиназы, которые обеспечивают выход шикимата в размере 14 г/л [20].

Подбор условий трансформации. В связи с тем что любая стратегия с применением молекулярно-генетических подходов предполагает введение и направленное изменение генетического материала в реципиентной клетке, на первом этапе нами изучалась способность к трансформации у анализируемых штаммов-кандидатов.

С использованием общепринятых условий [12; 21] перевести клетки анализируемых штаммов-кандидатов в компетентное состояние не удалось. Для клеток *B. subtilis* характерно формирование состояния физиологической компетентности на поздних этапах логарифмического роста. Однако необходимое для этого время определяется скоростью роста, которая варьирует в значительной степени в зависимости от используемого штамма и условий культивирования.

В целях определения параметров культивирования, оптимальных для развития компетентности, была изучена кинетика роста анализируемых штаммов в различных средах и осуществлен титр компетентности.

Анализ полученных данных позволил определить оптимальные условия для развития состояния компетентности для каждого штамма-кандидата. В связи с тем что точные временные рамки развития компетентности не установлены, для проведения трансформации использовали культуры, находящиеся на разных этапах экспоненциальной фазы роста. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Таким образом, были подобраны условия для перевода клеток указанных штаммов *B. subtilis* в состояние физиологической компетентности и получены их трансформанты с использованием векторных конструкций pLAV1, pAL1 и pAL2. С использованием ауксонографического теста определен их фенотип: исследуемые трансформанты подрачивали типовой штамм *B. subtilis* 168 trpC2, т. е. они получили указанные конструкции и сохранили способность к синтезу триптофана. Дополнительно факт плазмидоносительства подтверждали с помощью молекулярно-генетических методов и последующего электрофоретического анализа. Из полученных клонов выделяли плазмидную ДНК, с ее помощью трансформировали клетки *E. coli* DH5a либо *E. coli* XL-1 Blue, затем из них выделяли плазмидную ДНК, которую подвергали рестрикционному и электрофоретическому анализу. Размер и структура выделяемых конструкций соответствовали исходным.

Таблица 2

Оптимальные условия культивирования для перевода клеток *B. subtilis* в состояние физиологической компетентности

Table 2

Optimum conditions of cultivation for transfer of *B. subtilis* cells into a state of physiological competence

Штамм <i>B. subtilis</i>	Ночная культура			Этап 1				Этап 2				Эффективность, КОЕ на 1 мкг ДНК
	V_k	ПС	ОП, о. е., 600 нм	$V_{н.к}$	ПС	ОП, о. е., 600 нм	T_1 , мин	V_k	ПС	T_2 , мин	T_3 , мин	
168 trpC2	1/10	LB	2,6	1/25	CP1	0,6	300	1/10	CP2	60	40	$6,2 \cdot 10^5$
	1/10	LB	2,6	1/20	MG1	0,6	270	1/10	MG2	60	40	$6,2 \cdot 10^5$
ВНИИ Генетика-15	1/50	MG1	2,3	1/10	MG1	0,15	330	1/10	MG2	60	60	$0,2 \cdot 10^2$
ВНИИ Генетика-15 C10	1/50	CP1	2,6	1/10	CP1	0,43	210	1/10	CP2	80	60	$0,7 \cdot 10^2$
	1/50	MG1	2,3	1/10	MG1	0,33	210	1/10	MG2	60	40	$0,9 \cdot 10^2$
ВНИИ Генетика-15 D3	1/50	CP1	1,8	1/10	CP1	0,17	270	–	–	–	–	Нет
	1/50	MG1	2,3	1/10	MG1	0,25	330	–	–	–	–	Нет

Окончание табл. 2
Ending table 2

Штамм <i>B. subtilis</i>	Ночная культура			Этап 1				Этап 2				Эффективность, КОЕ на 1 мкг ДНК
	V_k	ПС	ОП, о. е., 600 нм	$V_{н.к}$	ПС	ОП, о. е., 600 нм	T_1 , мин	V_k	ПС	T_2 , мин	T_3 , мин	
КМБУ 2003	1/50	LB CP1	2,2	1/10	CP1	0,36	390	1/25	CP2	135	40	$2,1 \cdot 10^2$
	1/50	LB MG1	1,8	1/10	MG1	0,4	420	1/25	MG2	135	40	$0,9 \cdot 10^2$
ВКПМ 5434	1/50	CP1	1,9	1/20	CP1	0,3	310	1/10	CP2	60	40	$0,1 \cdot 10^2$
	1/50	MG1	1,8	1/20	MG1	0,3	310	1/10	MG2	60	40	$0,1 \cdot 10^2$

Примечание. V_k – объемная доля культуры в среде культивирования; ПС – состав питательной среды; ОП – значение оптической плотности (о. е.), 600 нм; $V_{н.к}$ – объемная доля ночной культуры в среде культивирования; T_1 , мин, – время культивирования на этапе 1 (в «богатой среде»); T_2 , мин, – время культивирования на этапе 2 (в «бедной среде») до внесения ДНК; T_3 , мин, – время культивирования на этапе 2 (в «бедной среде») после внесения ДНК; прочерк означает, что условия не подобраны; «нет» – трансформанты не получены.

При выполнении этого этапа работы была продемонстрирована принципиальная возможность проведения трансформации клеток указанных штаммов-кандидатов.

Стратегия инактивации шикиматкиназы. Анализ нуклеотидных последовательностей и дизайн праймеров. Шикимовая кислота является ключевым интермедиатом шикиматного пути и синтезируется из фосфоенолпирувата и эритрозо-4-фосфата в результате четырех ферментативных реакций. У *B. subtilis* эти реакции осуществляются ферментами, кодируемыми генами *aroA*, *aroB*, *aroC* и *aroD* соответственно. Превращение шикимовой кислоты в хоризмовую происходит в результате ферментативных реакций, осуществляемых ферментами, кодируемыми генами *aroI*, *aroE* и *aroF* (табл. 3). В общем пути биосинтеза ароматических соединений образующийся шикимат подвергается фосфорилированию под действием шикиматкиназы с образованием шикимат-3-фосфата. Для накопления шикимата необходимо исключить его дальнейшее превращение в шикимат-3-фосфат, а для этого следует инактивировать фермент, катализирующий данную реакцию. Шикиматкиназа кодируется геном *aroI*, который, как видно из табл. 3, расположен достаточно далеко от других генов шикиматного пути, в частности от генов *aroA*, *aroB*, *aroC* и *aroD*, и в отличие от них транскрибируется с плюс-цепи ДНК и не образует с ними единого оперона.

Таблица 3

Молекулярно-генетическая характеристика генетических детерминант
шикиматного пути у *Bacillus subtilis*

Table 3

Molecular genetic characteristic of genetic determinants of
shikimate pathway in *Bacillus subtilis*

Ген	Код доступа	Нить	Длина, п. о.	Координаты на бактериальной хромосоме	Фермент
<i>aroA</i>	16080027	–	359	3045445–3046521	3-Дезокси-D-арабино-гептулозонат-7-фосфатсинтаза (ДАГФ-синтаза)
<i>aroB</i>	16079327	–	363	2378012–2379100	3-Дегидрохинатсинтаза
<i>aroC</i>	16079365	–	256	2412706–2413473	3-Дегидрохинатдегидратаза
<i>aroD</i>	16079620	–	281	2644630–2645472	Шикимат-5-дегидрогеназа
<i>aroI</i>	16077384	+	187	340025–340585	Шикиматкиназа
<i>aroE</i>	16079317	–	429	2367954–2369240	5-Енолпирувилшикимат-3-фосфат-синтаза (3-фосфошикимат-1-карбоксивинилтрансфераза)
<i>aroF</i>	16079328	–	369	2379100–2380272	Хоризматсинтаза

Анализ нуклеотидной последовательности генома *B. subtilis* позволил определить мишень для интеграции. В качестве области гомологии выбран фрагмент бактериальной хромосомы, ограниченный генами *tmrB* и *aroI*, содержащий межгенную область с регуляторными элементами указанных генов, кодирующие последовательности которых локализованы соответственно на минус-цепи ДНК и плюс-цепи ДНК.

В целях амплификации целевого фрагмента синтезированы праймеры ShikF-NotI (5'-GCGGCCGCC ATTAGTGTAAGTGGTGAAC-3', $T_m = 53/61/52$) и ShikR-BamHI (5'-CCGGATCCGCCAGAGATACG ATTTTG-3', $T_m = 54/61/55$). Согласно нуклеотидной последовательности генома *B. subtilis* полученные праймеры позволяют амплифицировать фрагмент ДНК размером около 900 п. н. Для последующего клонирования продукта амплификации в состав вектора pMUTIN4 [22] синтезированные праймеры содержат на своих 5'-концах навески с сайтами распознавания для рестриктаз BamHI и NotI.

Для возможности проверки специфичности интеграции нами были разработаны праймеры для ПЦР-анализа, позволяющего установить наличие интегративной конструкции (табл. 4) в составе бактериальной хромосомы: Shik-TFAG (5'-ACAGCACAAGAGCGGAAAGATG-3', $T_m = 54/61/56$) и Shik-TRAG (5'-TGCTTCCAGTTCTCCCATGAC-3', $T_m = 54/61/54$).

Таблица 4

Количество и размер ожидаемых продуктов амплификации, получаемых при осуществлении ПЦР-скрининга рекомбинантных штаммов *B. subtilis*

Table 4

The number and size of the expected amplification products obtained by PCR screening of recombinant *B. subtilis* strains

Продукты амплификации, выявляемые при успешной интеграции разрабатываемой конструкции в состав бактериальной хромосомы			
№ п/п	Размер ампликона, п. о.	Прямой праймер	Обратный праймер
1	1123	Shik-TFAG	Shik-TRAG
2	1033	Shik-TFAG	ShikR-BamHI
3	970	ShikF-NotI	Shik-TRAG
4	885	ShikF-NotI	ShikR-BamHI
Продукты амплификации, выявляемые при отсутствии точной интеграции разрабатываемой конструкции в состав бактериальной хромосомы			
1	970	ShikF-NotI	Shik-TRAG
2	885	ShikF-NotI	ShikR-BamHI

При проведении ПЦР-анализа с использованием данных праймеров, а также праймеров ShikF-NotI и ShikR-BamHI продукты амплификации будут различны в случае точной интеграции конструкции в геном целевого штамма и при отсутствии таковой (см. табл. 4 и рисунок). Этот прием позволяет провести быстрый и точный скрининг рекомбинантов среди полученных трансформантов *B. subtilis*.

Подбор и оптимизация условий ПЦР для получения целевого фрагмента. С использованием в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции препаратов тотальной ДНК, выделенной из штаммов, обладающих повышенной способностью к синтезу триптофана, и типового штамма *B. subtilis* 168 trpC2, и разработанных праймеров ShikF-NotI и ShikR-BamHI были подобраны условия для получения целевого продукта. При оптимизации условий 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. Кроме того, модификация предусматривала понижение температуры стадии полимеризации с 72 °С (температура, оптимальная для эффективной работы Taq-полимеразы) до 68 °С (температура, рекомендуемая для работы с АТ-богатыми матрицами). Указанные изменения позволили выявить специфические продукты амплификации размером около 1 т. п. н. для всех проанализированных матриц. Для доказательства того, что полученные ампликоны имеют структуру, сходную с ожидаемой, они были подвергнуты рестрикции с использованием рестриктаз HindIII и PstI и последующему электрофоретическому разделению в агарозном геле.

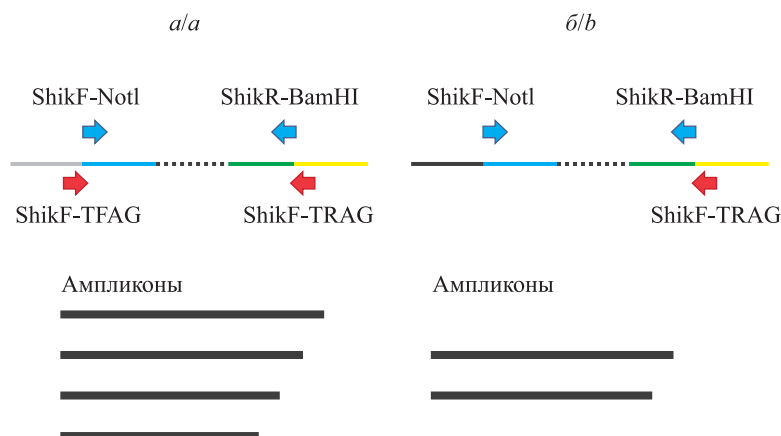


Иллюстрация принципа проведения ПЦР-скрининга рекомбинантных штаммов *B. subtilis*: организация участка генома (хромосомы): *a* – в случае точной интеграции разрабатываемой конструкции в бактериальную хромосому; *b* – при отсутствии интеграции. Фрагмент вектора pMUTIN4 представлен линией серого цвета, фрагмент гена *tmrB* – линией голубого цвета, ген *aroI* обозначен линиями зеленого и желтого цвета, межгенная область – пунктирной линией. Праймеры ShikF-NotI, ShikR-BamHI и ShikF-TFAG, ShikF-TRAG обозначены синими и красными стрелками соответственно

Illustration of the principle of PCR screening for recombinant *B. subtilis* strains: organization of the genome (chromosome): *a* – in the case of exact integration of the developed design into the bacterial chromosome; *b* – in the absence of integration. The fragment of the vector pMUTIN4 is represented by a gray line, the *tmrB* gene fragment is a blue line, the *aroI* gene is indicated by lines of green and yellow, the intergenic region by a dashed line. Primers ShikF-NotI, ShikR-BamHI and ShikF-TFAG, ShikF-TRAG, are indicated by blue and red arrows, respectively

Анализ электрофореграмм показал, что все полученные ампликоны имеют сходство в организации строения, но на основании электрофоретической подвижности выявляемых рестриктвов их можно разделить на две группы. К первой группе могут быть отнесены продукты, получаемые с препаратов тотальной ДНК следующих штаммов *B. subtilis*: ВКПМ 5434, ВНИИ Генетика-15 D4 и КМБУ 2003-2, ко второй – 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 созданы используемые в работе штаммы.

Заключение

В результате выполнения настоящей работы были 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. На основе метода ПЦР разработана система для быстрого скрининга трансформантов на наличие рекомбинационных перестроек генома и интегративной конструкции в составе бактериальной хромосомы трансформированного штамма. Показана возможность трансформации штаммов-кандидатов, перспективных для создания штаммов – продуцентов шикимовой кислоты. Полученные результаты являются важной основой для дальнейшего конструирования продуцентов.

Библиографические ссылки

1. Zhang Y., Liu A., Ye Z. G., et al. New Approach to the Total Synthesis of (–)-Zeylenone from Shikimic Acid // Chem. & Pharm. Bull. 2006. Vol. 54, № 10. P. 1459–1461.
2. Bradley D. Star role for bacteria in controlling flu pandemic? // Nature Rev.: Drug Discovery. 2005. Vol. 4, № 12. P. 945–946.
3. Mair H.-J. Process for the preparation of shikimic acid its derivatives / US006130354 (A). 2000-10-10.
4. Raghavendra T. R., Vaidyanathan P., Swathi H. K., et al. Prospecting for alternate sources of shikimic acid, a precursor of Tami-flu, a bird-flu drug // Current sci. 2009. Vol. 96, № 6. P. 771–772.
5. Brazdova B., Tan N. S., Samoshina N. M., et al. Novel easily accessible glucosidase inhibitors: 4-hydroxy-5-alkoxy-1,2-cyclohexanedicarboxylic acids // Carbohydrate Research. 2008. Vol. 344, № 3. P. 311–321.
6. Lingens F. The Biosynthesis of Aromatic Amino Acids and its Regulation // Angewandte Chem. Int. Ed. 2003. Vol. 7, № 5. P. 350–360.

7. Ruohong S. Separation of Shikimic Acid from Pine Needles // *Chem. Engineering & Technology*. 2008. Vol. 31, № 3. P. 469–473.
8. Shinada T., Yoshida Y., Ohfuné 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.
9. Adachi O., Ano Y., Toyama H., et al. High shikimate production from quinate with two enzymatic systems of acetic acid bacteria // *Biosci., Biotech., a. Biochem.* 2006. Vol. 70, № 10. P. 2579–2582.
10. 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.
11. Bullock W. O., Fernandez J. M., Short J. M. XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection // *BioTech*. 1987. Vol. 5, № 3. P. 376–379.
12. Anagnostopoulos C., Spizizen J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis* // *J. of Bacteriology*. 1961. Vol. 81, № 5. P. 741–746.
13. Сенаторова В. Н. Исследование процесса и создание технологии биосинтеза L-триптофана штаммом-продуцентом *Bacillus subtilis* ВНИИгенетика-15 : дис. ... канд. техн. наук : 03.00.23. М., 2000.
14. Lahodzhich A. V. Plasmids of pBS72 family as a basis for creation of vector systems // *Biotechnology of the Future: EU-Russia: Prospects for Cooperation in Biotechnology in the Seventh Framework Programme* : proc. to the Int. symp. (Saint Petersburg, 5–8 June, 2006). Moscow, 2006. P. 47–48.
15. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Lab. : Cold Spring Harbor Publishing, 1989.
16. 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.
17. Schallmeyer M., Singh A., Ward O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production // *Canad. J. Microbiol.* 2004. Vol. 50, № 1. P. 1–17.
18. Kunst F., Ogasawara N., Moszer I. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* // *Nature*. 1997. Vol. 390, № 6657. P. 249–256.
19. *Bacillus subtilis* 168 Genome Page [Electronic resource]. URL: <http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/GenomePage.cgi?org=ntbs01> (date of access: 15.04.2011).
20. Iomantas Yurgis A. V., Abalkina E. G., Polanuer B. M., et al. Method for producing shikimic acid // US6436664.2002-08-20.
21. Bron S. Plasmids // *Molecular Biological Methods for Bacillus* / ed. by C. R. Harwood. Chichester : John Wiley a. Sons Ltd., 1990. P. 75–174.
22. Vagner V., Dervyn E., Ehrlich S. D. A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis* // *J. Microbiol.* 1998. Vol. 144, № 11. P. 3097–3104.

References

1. Zhang Y., Liu A., Ye Z. G., et al. New Approach to the Total Synthesis of (–)-Zeylenone from Shikimic Acid. *Chem. & Pharm. Bull.* 2006. Vol. 54, No. 10. P. 1459–1461.
2. Bradley D. Star role for bacteria in controlling flu pandemic? *Nature Rev.: Drug Discovery*. 2005. Vol. 4, No. 12. P. 945–946.
3. Mair H.-J. Process for the preparation of shikimic acid its derivatives. *US006130354 (A)*. 2000-10-10.
4. Raghavendra T. R., Vaidyanathan P., Swathi H. K., et al. Prospecting for alternate sources of shikimic acid, a precursor of Tami-flu, a bird-flu drug. *Current sci.* 2009. Vol. 96, No. 6. P. 771–772.
5. Brazdova B., Tan N. S., Samoshina N. M., et al. Novel easily accessible glucosidase inhibitors: 4-hydroxy-5-alkoxy-1,2-cyclohexanedicarboxylic acids. *Carbohydrate Research*. 2008. Vol. 344, No. 3. P. 311–321.
6. Lingens F. The Biosynthesis of Aromatic Amino Acids and its Regulation. *Angewandte Chem. Int. Ed.* 2003. Vol. 7, No. 5. P. 350–360.
7. Ruohong S. Separation of Shikimic Acid from Pine Needles. *Chem. Engineering & Technology*. 2008. Vol. 31, No. 3. P. 469–473.
8. Shinada T., Yoshida Y., Ohfuné Y. Direct conversion of 1,2-diol into allyl sulfide. Regioselective transformation of (–)-quinic acid to (–)-shikimic acid. *Tetrahedron Letters*. 1998. Vol. 39, No. 33. P. 6027–6028.
9. Adachi O., Ano Y., Toyama H., et al. High shikimate production from quinate with two enzymatic systems of acetic acid bacteria. *Biosci., Biotech., a. Biochem.* 2006. Vol. 70, No. 10. P. 2579–2582.
10. 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, No. 7. P. 1677–1678.
11. Bullock W. O., Fernandez J. M., Short J. M. XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTech*. 1987. Vol. 5, No. 3. P. 376–379.
12. Anagnostopoulos C., Spizizen J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. of Bacteriology*. 1961. Vol. 81, No. 5. P. 741–746.
13. Senatorova V. N. The study of the process and creation of technology of biosynthesis of L-tryptophan strain-producer *Bacillus subtilis* Of-15 : dissertatsiya... kandidata tech. nauk : 03.00.23. Moscow, 2000 (in Russ.).
14. Lahodzhich A.V. Plasmids of pBS72 family as a basis for creation of vector systems. *Biotechnology of the Future: EU-Russia: Prospects for Cooperation in Biotechnology in the Seventh Framework Programme* : affiliated to the Int. symp. (Saint Petersburg, 5–8 June, 2006). Moscow, 2006. P. 47–48.
15. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Lab. : Cold Spring Harbor Publishing, 1989.

16. Birnboim H. L., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 1979. Vol. 7, No. 6. P. 1513–1523.
17. Schallmey M., Singh A., Ward O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canad. J. Microbiol.* 2004. Vol. 50, No. 1. P. 1–17.
18. Kunst F., Ogasawara N., Moszer I. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*. 1997. Vol. 390, No. 6657. P. 249–256.
19. *Bacillus subtilis* 168 Genome Page. URL: <http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/GenomePage.cgi?org=ntbs01> (date of access: 15.04.2011).
20. Iomantas Yurgis A. V., Abalkina E. G., Polanuer B. M., et al. Method for producing shikimic acid. *US6436664.2002-08-20*.
21. Bron S. Plasmids. *Molecular Biological Methods for Bacillus*. Chichester : John Wiley a. Sons Ltd., 1990. P. 75–174.
22. Vagner V., Dervyn E., Ehrlich S. D. A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol.* 1998. Vol. 144, No. 11. P. 3097–3104.

Статья поступила в редколлегию 15.09.2017.
Received by editorial board 15.09.2017.