УДК 579.852+579.22+57.044

BACILLUS INTERMEDIUS С НОКАУТИРОВАННЫМ ГЕНОМ СУБТИЛИЗИНОПОДОБНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ

А.А. Тойменцева, М.Р. Каримова, А.А. Ризванов,
Е.И. Шагимарданова, М.Р. Шарипова

Аннотация

Проведено нокаутирование гена субтилизиноподобной протеиназы (*aprBi*) в геноме бактерий *B. intermedius.* Установлена пониженная устойчивость модифицированного штамма к стрессовым условиям. Выявлены отличия в спектрах внеклеточных белков модифицированного и дикого штаммов: электрофоретический анализ клеточных фракций штамма $AprBi^-$ показал изменения в распределении полос и соотношении долей одинаково расположенных с штаммом $AprBi^+$ белковых фракций.

Ключевые слова: *Bacillus intermedius*, субтилизиноподобная протеиназа, инактивация гена, гомологичная рекомбинация, стрессы.

Введение

Бациллы характеризуются высокой способностью к секреции в среду различных внеклеточных биологически активных белков, в частности протеолитических ферментов [1–3]. Состав и соотношение компонентов внеклеточного протеолитического спектра бацилл зависят от физиологических особенностей штамма и контролируются условиями среды [4–6]. Роль каждой из протеиназ до сих пор точно не установлена. Известно, что они могут выполнять ключевую роль в процессах клеточной дифференцировки, участвуют в превращениях внеклеточных субстратов, а продукты расщепления, пептиды, могут выполнять регуляторную функцию на уровне бактериальной популяции [7]. Вместе с тем эти ферменты – потенциальные участники процессинга внеклеточных белков, поэтому могут выступать как регуляторные ферменты на посттрансляционном уровне при формировании пула внеклеточных белков бацилл. Кроме того, секретируемые протеиназы могут рассматриваться как определенные факторы, влияющие на фундаментальные процессы клетки, рост и морфологию штаммов, а также бактериальной популяции в целом. Для оценки вклада каждого из компонентов протеолитического спектра в указанные процессы может быть использован метод последовательной инактивации генов соответствующих протеиназ [8, 9].

Субитилизиноподобная сериновая протеиназа *B. intermedius* (К.Ф. 3.4.21.62) секретируется клетками в среду, доля фермента в пуле внеклеточных протеиназ доминирует и составляет более 80% [10]. Фермент с молекулярной массой 27 кДа [11, 12] проявляет широкую субстратную специфичность при гидролизе белковых

субстратов с оптимумом pH 11 [13]. Ген фермента клонирован и секвенирован (EMBL AN AY 754946) [10, 14].

Целью настоящей работы является характеристика штамма с инактивированным геном субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius*

1. Материалы и методы

Штаммы и плазмиды. В работе использовали стрептомицинустойчивый штамм *B. intermedius* 3-19 из музея Казанского университета для проведения генетической рекомбинации, мультикопийную плазмиду pCS9 с геном субтилизиноподобной протеиназы AprBi под собственным промотором в составе 6.0-kb фрагмента геномной ДНК *B. intermedius* 3-19 и ген устойчивости к эритромицину. В качестве штамма-реципиента для рекомбинантных плазмид на основе вектора pGEM-T Easy (Promega, USA) использовали штамм *E. coli* XLI-Blue. Штамм *B. intermedius* MK10 (*aprBi*$^-$) получен на основе штамма *B. intermedius* 3-19, в геноме которого путем гомологичной рекомбинации нарушена рамка считывания гена субтилизиноподобной протеиназы за счет встраивания гена резистентности к эритромицину (схема 1).

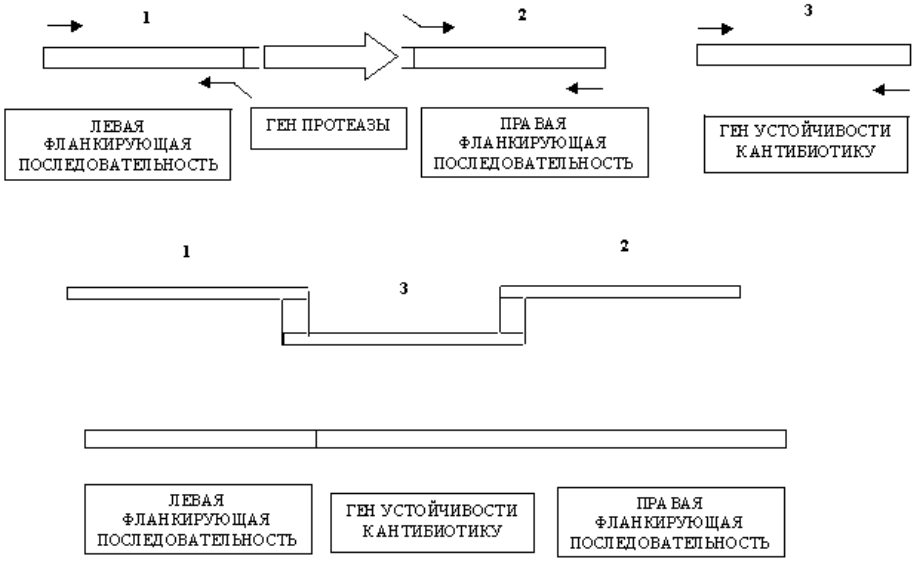

Схема 1. Конструирование тройной рекомбинирующей конструкции на основе гена устойчивости к эритромицину и участков ДНК, фланкирующих ген *aprBi*

Для культивирования исходного штамма *B. intermedius* 3-19 и рекомбинантных штаммов *E. coli*, *B. subtilis* использовали среду LB [15]. Агаризованная среда LB включала дополнительно 2% агара. Молочный агар для отбора клонов, секретирующих протеиназу, включает 30% обезжиренного молока и 2% агара. Для создания условий солевого стресса в среду LB дополнительно вносили хлорид натрия до конечных концентраций 0.5 и 1 М. Среды стерилизовали при 1 атм. Антибиотики добавляли в среду в конечных концентрациях (мкг/мл): стрептомицин – 10, ампициллин – 20, эритромицин – 20. Культивирование бактерий проводили в колбах объемом 100 мл при соотношении объема среды к объему

колбы 1 : 7 на термостатируемом вибростенде с интенсивностью качания 200 об/мин при температуре 37 °С. Посевным материалом служила 18-часовая ночная культура. Контроль за ростом культуры осуществляли по изменению оптической плотности ($ОП_{590}$) культуры. Прирост биомассы определяли нефелометрически на ФЭК-56 ПМ со светофильтром 9 при длине волны 590 нм. За единицу биомассы принимали поглощение в 1-сантиметровой кювете.

Получение рекомбинирующей конструкции. Последовательность гена субтилизиноподобной сериновой протеиназы *B. intermedius* секвенирована и зарегистрирована в базе данных GenBank под номером AN AY754946 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/60202140). Инактивацию гена *aprBi* в геноме *B. intermedius* проводили согласно схеме на рис. 1. Были амплифицрованы 1kb-фланкирующие участки гена *aprBi* с использованием праймеров, имеющих перекрывающиеся последовательности с геном эритромицина (табл. 1). Синтезированные последовательности ДНК использовали в качестве матрицы для получения двойных конструкций, обозначаемых как LE (left fragment + эритромицин) и ER (эритромицин + right fragment). Данные фрагменты были клонированы в плазмиду pGEM-T Easy лигированием по Т-концам плазмиды и А-концам амплификатов. Плазмиды, несущие двойные конструкции, были использованы для синтеза тройной рекомбинирующей конструкции в одном раунде полимеразной цепной реакции (ПЦР). Продукт амплификации с молекулярной массой 3 kb, включающий ген антибиотика *Em*, левую и правую фланкирующие последовательности гена *aprBi*, был очищен из геля набором EZ-10 Spin Column PCR Purification Kit (Biobasic, Китай). Полученной рекомбинантной ДНК был трансформирован штамм *B. intermedius* 3-19, селекцию проводили на среде, содержащей эритромицин и стрептомицин.

Все реакции амплификации ДНК проводили с помощью термоциклера MJ mini производства фирмы BioRad (США). Количество ПЦР-продукта определяли методом гель-электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Выделение плазмидной ДНК проводили с помощью набора GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Латвия). Трансформацию клеток *E. coli* проводили по стандартной методике с использованием 0.1 М $CaCl_2$ [16]. Трансформацию клеток *B. intermedius* плазмидной ДНК проводили, как описано в работе [17].

Белковый электрофорез проводили в 12.5%-ном ПААГ в присутствии SDS по методу Лэммли [18].

Определение протеолитической активности. Протеолитическую активность определяли по расщеплению хромогенных пептидных субстратов [19, 20]. Активность на азоказеине определяли по отщеплению красителя от азоказеина (фирма Sigma, США). Субстратом являлся раствор 1% казеина в 0.05 М Tris-HCl-буфере, pH 8.5. За единицу активности принимали количество фермента, гидролизующего в условиях эксперимента 1 мкмоль субстрата за 1 мин. Удельную активность выражали в ед./мг белка.

Для подсчета клеток с проспорами и свободных спор культуру окрашивали по Пешкову [21]. Количество спор выражали в процентах по отношению к общему количеству вегетативных и спорулирующих клеток (100%), подсчет которых

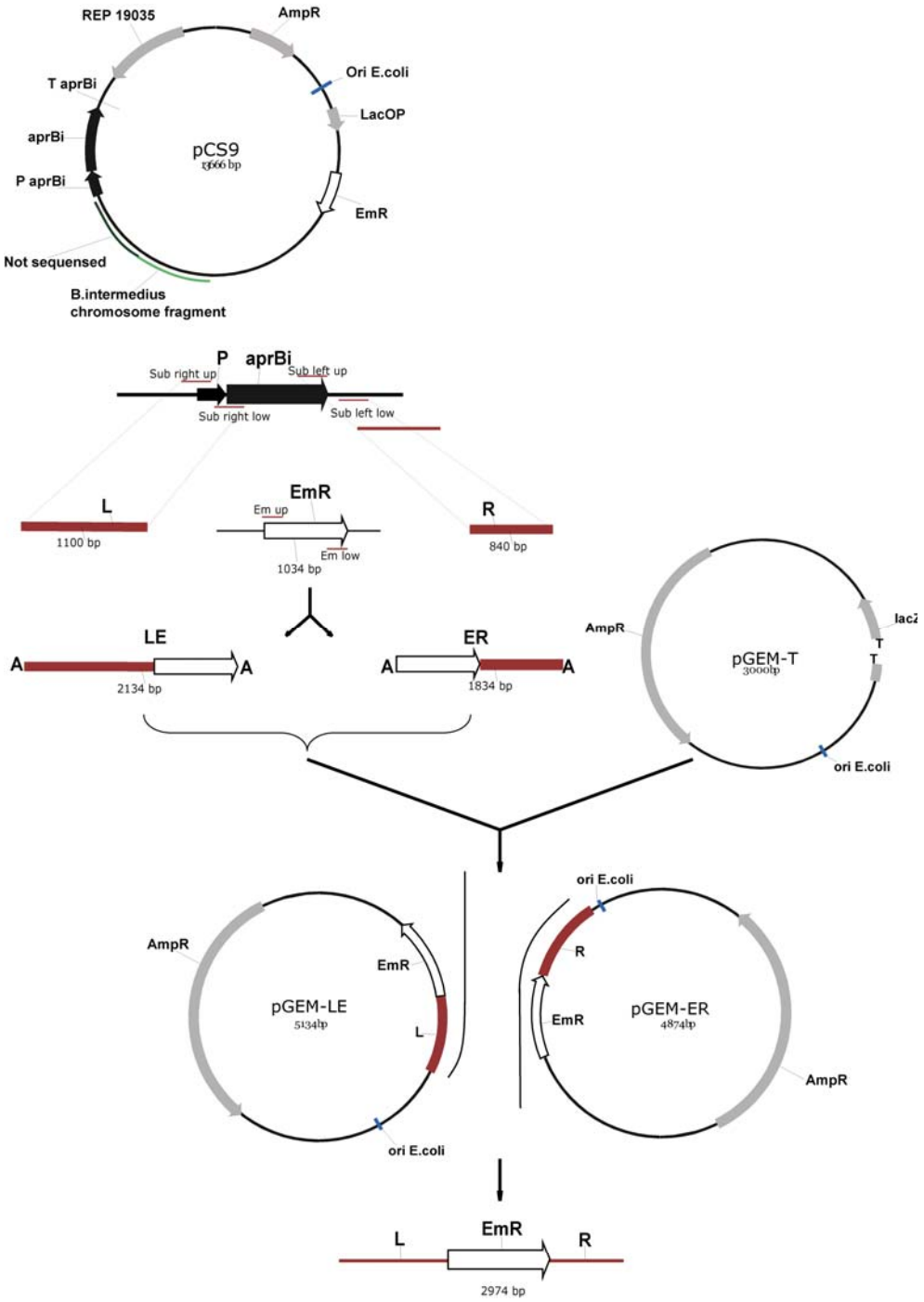

Рис. 1. Получение тройной рекомбинирующей конструкции для инактивации гена *aprBi* в геноме *B. intermedius*. На первом этапе были синтезированы левый (L) и правый (R) фланкирующие участки гена *aprBi*, ген *Em* (E). Далее, данные последовательности служили матрицей для создания двойных конструкций LE и ER с использованием перекрывающихся праймеров. Полученные фрагменты были клонированы в плазмиду pGEM-T Easy (pGEM-LE, pGEM-ER). Плазмиды, несущие двойные конструкции, использовались при создании химерной тройной рекомбинирующей конструкции

Табл. 1

Олигонуклеотиды, использованные в работе, перекрывающиеся последовательности подчеркнуты

Название	Последовательность праймера
Sub left up	5' GAAGTCAAACAAACGGTGTCC 3'
Sub left low	5' GAATACCAACATGACGAATCCCCCACGTTGTAATCAAGGACC 3'
Sub right up	5' GGGCACTCTAATAACTACCAAAATTGGTGTTCTTGGGGTCG 3'
Sub right low	5' AGAGAGGGATCCGAGAGGCAGGGGTGACGTCTTTTC 3'
Em up	5' GGGATTCGTCATGTTGGTATTC 3'
Em low	5' ATTGGTAGTTATTAGAGTGCCC 3'

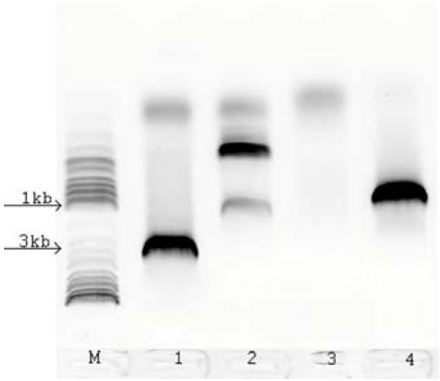

Рис. 2. Электрофорез в 1%-ном агарозном геле продуктов ПЦР анализа геномной ДНК контрольного штамма *B. intermedius* 3-19 и нокаутированного штамма *B. intermedius* MK10. M – ДНК-маркер (MassRuler DNA Ladder Mix, Fermentas Латвия), 1 – ПЦР тройной конструкции с праймеров sub left up и sub right low контрольного штамма, 2 – опытного штамма, 3 – ПЦР на наличие гена эритромицина в геномной ДНК контрольного штамма, 4 – опытного штамма

проводили в режиме фазово-контрастной микроскопии при увеличении в 1600 раз в 5 полях зрения.

Микроскопирование проводили с использованием микроскопа MicrosMC300 (Австрия) с иммерсией при увеличении в 300 раз. Размеры микроорганизмов оценивали по цифровым изображениям микроскопирования клеток.

Математическую обработку результатов проводили в программе Microsoft Excel путем расчета среднеквадратичного отклонения (σ). Результаты считали достоверными при $\sigma \leq 10\%$. При расчете достоверности получаемых разностей использовали критерий Стьюдента, принимая $P \leq 0.05$ за достоверный уровень значимости.

2. Результаты и их обсуждение

Получение штамма с инактивированным геном *aprBi.* Одним из наиболее информативных методов исследования функций и биологической значимости белков является «выключение» соответствующего гена [8]. С учетом этого нами

была сконструирована рекомбинирующая последовательность ДНК на основе гена устойчивости к эритромицину для инактивации гена субтилизиноподобной протеиназы в хромосомной ДНК *B. intermedius* путем гомологичной рекомбинации.

После проведения гомологичной рекомбинации и отбора трансформантов на среде, содержащей эритромицин в качестве селективного маркера, все отобранные клоны полностью утратили способность расщеплять хромогенный субстрат для субтилизинов Z-Ala-Ala-Leu-pNA, в то время как исходный штамм *B. intermedius* 3-19 проявлял высокую активность в отношении этого субстрата. Для работы нами выбран штамм № 10 *B. intermedius* 3-19 с инактивированным геном *aprBi* и назван *B. intermedius* МК10. Проведение ПЦР-анализа на наличие в геноме полученного штамма гена устойчивости к эритромицину показало, что опытный вариант (*B. intermedius* МК10), в отличие от контроля (*B. intermedius* 3-19) содержит кассету резистентности (рис. 2). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что векторная конструкция, несущая ген устойчивости к эритромицину, интегрировала в хромосомную ДНК *B. intermedius* 3-19, в результате чего произошла инактивация гена *aprBi.*

Эти результаты коррелируют с полученными в ходе работы данными об изменениях на уровне морфологии и физиологии у штамма, дефектного по субтилизиноподобной протеиназе.

Морфологические свойства штамма *B. intermedius* МК10. Охарактеризованы морфологические особенности модифицированного штамма *B. intermedius* МК10. Поверхность колоний с инактивированным геном субтилизиноподобной протеиназы при росте на агаризованной среде LB была шероховатой, колонии имели неровные края по сравнению с гладкими и ровными колониями дикого типа.

При микроскопировании установлено, что клетки мутантного штамма представляют собой грамположительные одиночные палочки. При выращивании в идентичных условиях модифицированные клетки были более крупные, их размер составляет около 14–15 мкм, а исходных – 7–8 мкм (рис. 3).

Анализ протеолитической активности штамма *B. intermedius* МК10. Поскольку бактерии *B. intermedius* выделяют в культуральную жидкость различные протеолитические белки, среди которых инактивирован ген субтилизиноподобной протеиназы, представляло интерес определить активность штамма на специфических субстратах. При росте на идентификационной среде (молочном агаре) выраженные зоны протеолиза определялись у дикого штамма *B. intermedius* 3-19 (рис. 4). У мутантного штамма *B. intermedius* МК10 зоны расщепления заметно редуцированы, что подтверждает данные о доминирующей доле белка, ген которого выключен, в наборе внеклеточных протеиназ. Наличие остаточных зон лизиса, вероятно, объясняется присутствием активности других секретируемых протеаз (глутамилэндопетидаза и нейтральная протеаза).

Была исследована активность рекомбинантного штамма по отношению к специфическим субстратам протеаз (рис. 5). Установлено, что штамм *B. intermedius* МК10 не проявляет активности по отношению к специфическому субстрату

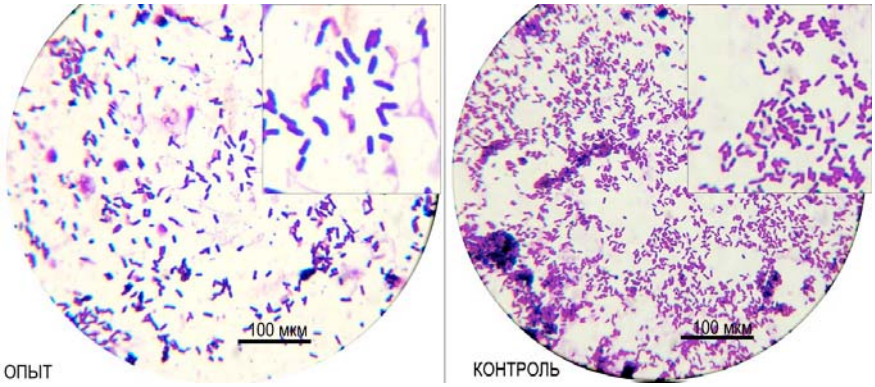

Рис. 3. Клетки нокаутированного штамма *B. intermedius* MK10 (опыт) и дикого штамма *B. intermedius* 3-19 (контроль), микроскопирование с иммерсией, увеличение в 300 раз (Micros MC 300, Австрия)

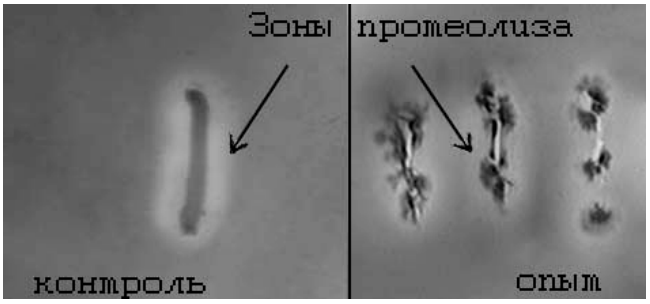

Рис. 4. Колонии дикого штамма *B. intermedius* 3-19 (контроль) и нокаутированного штамма *B. intermedius* MK10 (опыт) на молочном агаре. Стрелочками указаны просветленные зоны протеолиза белков вокруг колоний

для субтилизинопободной протеиназы Z-Ala-Ala-Leu-pNA. Расщепление азоказеина у модифицированного штамма снижено более чем в 10 раз по сравнению с исходным штаммом.

Данные свидетельствуют о том, что основной вклад в гидролиз этого субстрата вносит инактивированная протеаза. Тем не менее в расщеплении азоказеина участвуют также другие внеклеточные протеиназы, компоненты протеолитического спектра *B. intermedius* (рис. 5).

Различия между модифицированным и диким штаммами в расщеплении специфического субстрата Z-Glu-pNA для внеклеточной глутамилэнодопептидазы достоверно не выявлены. По нашим данным на долю этого фермента приходится менее 10% в пуле внеклеточных протеиназ этих бактерий [20]. Таким образом, анализ экспериментов по расщеплению субстратов свидетельствует об инактивации гена субтилизиноподобной протеиназы.

Субтилизиноподобная протеиназа в клетках дикого типа начинает накапливаться в культуральной жидкости на стадии замедления роста культуры, максимальное накопление фермента в культуральной жидкости происходит в поздней стационарной фазе и соответствует стадии созревания эндоспор и их освобождения в среду [22, 23].

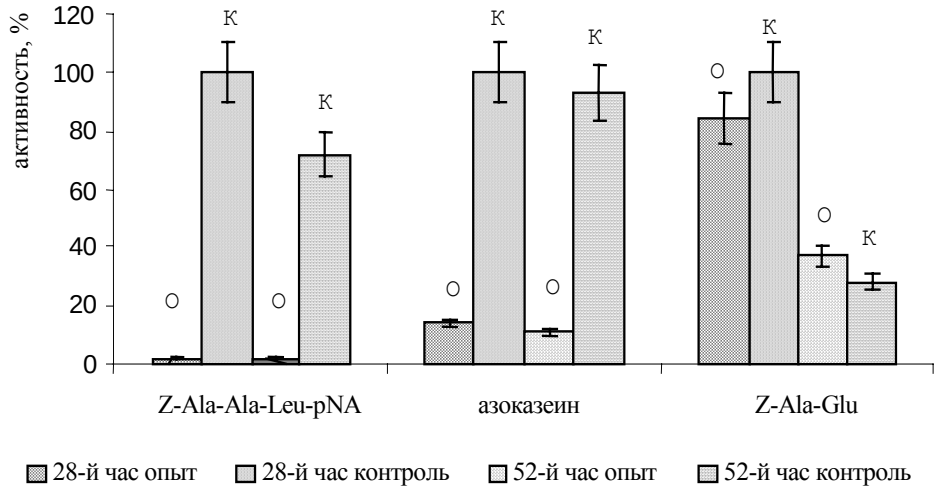

Рис. 5. Активность по гидролизу специфических субстратов Z-Ala-Ala-Leu-pNA, азоказеина и Z-Glu-pNA культуральной жидкости нокаутированного *B. intermedius* MK10 (опыт) и контрольного *B. intermedius* 3-19 штаммов на разные часы роста

Исследовали динамику роста и определяли активность по расщеплению хромогенного субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNA двух штаммов, исходного и модифицированного. У контрольного штамма идентифицированы два пика активности фермента на 28-й и 48-й часы роста бактерий (рис. 6), что согласуется с ранее полученными данными [10, 12]. У нокаутированного штамма в течение 72 ч *B. intermedius* MK10 активность по отношению к специфическому субстрату Z-Ala-Ala-Leu-pNA в культуральной жидкости отсутствовала. Отмечено замедление роста бактерий нокаутированного штамма по отношению к дикому, накопление биомассы было на 30% ниже, чем у исходного штамма, максимум накопления биомассы нокаутированного штамма приходился на 28-й час, тогда как для штамма дикого типа – на 22-й (рис. 6).

Динамика спорообразования штамма нокаутированного по гену *aprBi*. Инициация споруляции (стадия 0) была зафиксирована в начале стационарной фазы роста. У контрольного штамма свободные споры появляются на 26–30-й час роста (не более 5%, IV стадия спорообразования), далее их количество нарастало и достигало максимального значения (до 80%) на 68–72-й час культивирования, что соответствовало VII стадии споруляции (рис. 6). Нокаутированный штамм, дефектный по протеазе AprBi, имеет общую тенденцию к отставанию в росте бактерий, при этом наблюдается задержка в споруляции на 4 ч по отношению к исходному штамму. Поскольку образование щелочных протеиназ на регуляторном уровне связано с процессами клеточной дифференцировки, то отсутствие функционально активной субтилизиноподобной протеиназы привело к пролонгации вегетативного роста и смещению точки начала инициации споруляции бактериальной культуры.

Ранее было установлено, что синтез субтилизинопободной протеиназы *B. intermedius* индуцируется в ответ на увеличение солености среды [14, 24]. Нами исследовалось влияние высоких концентраций соли на рост нокаутированного

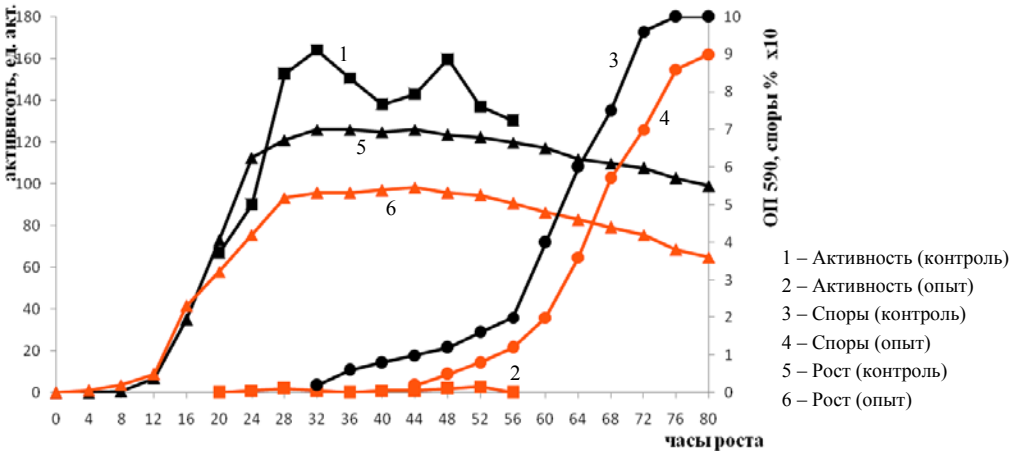

Рис. 6. Динамика роста, накопления субтилизиноподобной протеиназы и спор у штамма *B. intermedius* MK10 (опыт) и исходного *B. intermedius* 3-19 (контроль) штаммов. Максимальная активность фермента, показания при $ОП_{590}$ и максимальное количество спор приняты за 100%

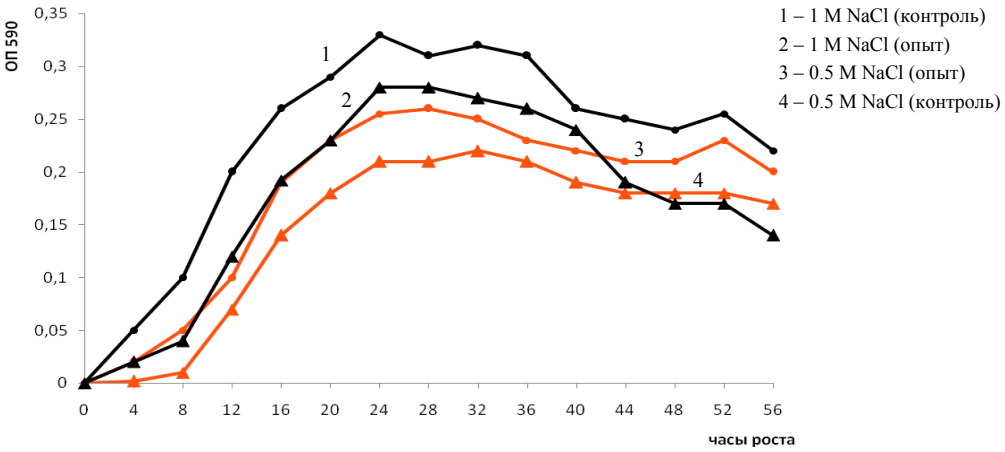

Рис. 7 Динамика роста нокаутированного штамма *B. intermedius* MK10 (опыт) и дикого штамма *B. intermedius* 3-19 (контроль) в присутствии 0.5 и 1 M NaCl. Результаты считали достоверными при среднеквадратичном отклонении $\sigma \leq 10\%$

штамма AprBi$^-$ (рис. 7). Присутствие в среде хлорида натрия в концентрации 0.5–1 M не сказывалось на росте исходного штамма. Рост штамма с инактивированным геном *aprBi* по отношению к дикому типу ингибировался на 20% при добавлении в среду хлорида натрия в концентрации 0.5 M, а в присутствии 1 M NaCl рост модифицированного штамма достоверно снижался на 35% (рис. 7). Полученные нами данные указывают на пониженную устойчивость к стрессовым факторам клеток, лишенных субтилизиноподобной протеиназы, что соответствует полученным ранее данным о роли субтилизиноподобной протеиназы в ответе на солевой стресс, а также данным о регуляции экспрессии гена двухкомпонентной системой сигнальной трансдукции DegS-DegU [3, 10, 14, 24, 25].

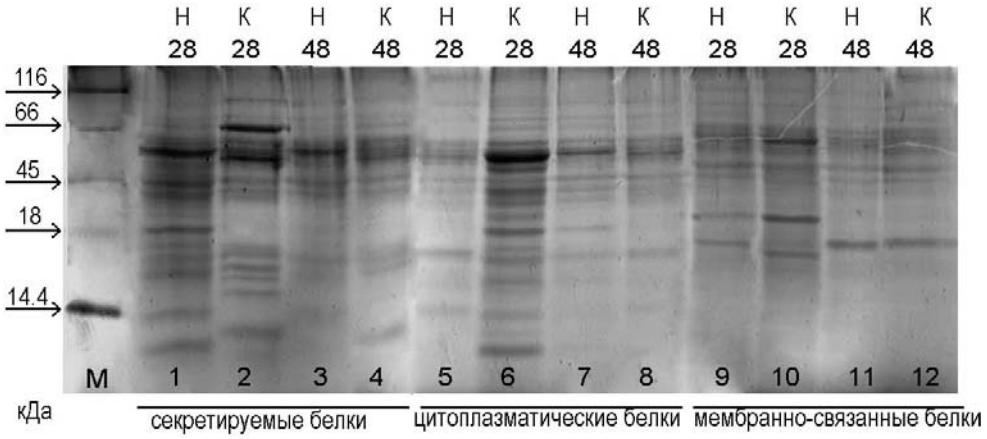

Рис. 8. Протеомный анализ мутантного по гену *aprBi* штамма *B. intermedius* MK10. Электрофорез в 12.5%-ном полиакриламидном геле секретируемых, цитоплазматических и мембраносвязанных белков нокаутированного штамма *B. intermedius* MK10 и дикого штамма *B. intermedius* 3-19. Сверху цифрами указаны часы роста. 1, 3, 5, 7, 9, 11 – белки нокаутированного штамма *B. intermedius* MK10; 2, 4, 6, 8, 10, 12 – белки дикого штамма *B. intermedius* 3-19. M – маркер молекулярного веса белков: лизоцим (14.4 кДа), b-лактоглубин (18 кДа), овальбумин (45 кДа), БСА (бычий сывороточный альбумин) (66 кДа), b-галактозидаза (116 кДа)

Сравнительная характеристика белкового состава штамма *B. intermedius* MK10. Одним из путей исследования физиолого-биохимического статуса бактерий является электрофоретическое исследование спектра белков в клеточных фракциях. Мы проводили электрофоретическое исследование белков клеточных фракций исходного и модифицированного штаммов путем сравнительного анализа их состава после проведения SDS-ПААГ-электрофореза.

Нами идентифицированы различия в белковых спектрах клеточных фракций нокаутированного и дикого штаммов (рис. 8). В белковых спектрах цитоплазмы, мембраны и культуральной жидкости модифицированного и исходного штаммов меняются распределение полос и доля одинаково расположенных белковых фракций с одинаковой электрофоретической подвижностью (рис. 8).

Эти результаты коррелируют с полученными в ходе работы данными об изменениях на уровне морфологии и физиологии у штамма, дефектного по субтилизиноподобной протеиназе. Поскольку основной функцией таких стратегически важных белков, как протеазы бацилл, является участие в белковом обмене клетки, в спорогенезе и посттрансляционной модификации белков, то ответ на выключение основного секретируемого протеолитического фермента клетки может проявляться на всех уровнях внутри- и внеклеточного метаболизма. В связи с этим наблюдаемая картина отсутствия или перераспределения определенных белковых фракций у нокаутированного штамма по сравнению с диким является вполне закономерной.

Отметим, что полученный штамм *B. intermedius* с выключенным геном внеклеточной субтилизиноподобной сериновой протеиназы является удобным штаммом-реципиентом для клонирования генов гетерологичных белков, чувствительных к протеолизу.

Работа поддержана грантами: РФФИ (№ 09-04-99044), Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» 2009–2013 гг. (ГК № П1053), Аналитической ведомственной целевой Федеральной программы (РНП 2.11.1005).

Авторы выражают благодарность профессору С.В. Кострову и кандидату химических наук И.В. Демидюку (Институт молекулярной генетики РАН, г. Москва) за предоставленную плазмиду pCS9.

Summary

A.A. Toymentseva, M.R. Karimova, A.A. Rizvanov, E.I. Shagimardanova, M.R. Sharipova. Bacillus Intermedius with a Knocked-Out Gene of Subtilisin-Like Protease.

The gene of subtilisin-like protease (*aprBi*) was knocked out in a genome of *Bacillus intermedius*. A low stress resistance of the modified strain was established. Some differences in the spectra of extracellular proteins of the native and modified strains were revealed. Analysis of cell fractions by gel-electrophoresis demonstrated protein band shift and the changes in concentration of identically expressed protein fractions.

Key words: *Bacillus intermedius*, subtilisin-like protease, gene inactivation, homologous recombination, stresses.

Литература

1. *Priest F.G.* Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus* // Bacteriol. Rev. – 1977. – V. 41, No 3. – P. 711–753.
2. *Msadek T.* When the going gets tough: survival strategies and environmental signaling networks in *Bacillus subtilis* // Trends Microbiol. – 1999. – V. 7, No 5. – P. 201–207.
3. *Veening J.-W., Igoshin O.A., Eijlander R. T., Nijland R., Hamoen L.W., Kuipers O.P.* Transient heterogeneity in extracellular protease production by *Bacillus subtilis* // Mol. Syst. Biol. – 2008. – V. 4, No 184. – P. 1–15.
4. *Nascimento W.C.A., Martins M.L.L.* Production and properties of an extracellular protease from thermophilic. *Bacillus* sp. // Brazil. J. Microbiol. – 2004. – V. 35. – P. 91–96.
5. *Маликова Л.А., Балабан Н.П., Габдрахманова Л.А., Марданова А.М., Шарипова М.Р.* Питательная среда для эффективной продукции глутамилэндопептидаз, секретируемых в стационарной фазе роста *Bacillus amyloliquefaciens* H2 // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2007. – Т. 149, № 1. – С. 79–88.
6. *Балабан Н.П., Марданова А.М., Маликова Л.А., Ильинская О.Н., Шарипова М.Р.* Биосинтез субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus amyloliquefaciens* H2 и биологические свойства фермента // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2008. – Т. 150, № 2. – С. 81–90.
7. *Dancer B.N., Mandelstam J.* Production and possible function of serine protease duing sporulation of *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. – 1975. – V. 121, No 2. – P. 406–410.
8. *Worrall A.F.* Site-directed mutagenesis by the cassette method // DNA-Protein Interactions. Principles and Protocols. Ser.: Methods in Molecular Biology. – 1994. – V. 30 – P. 199–210.
9. *Okuda S., Igarashi R., Kusui Y., Kasahara Y., Morisaki H.* Electrophoretic mobility of *Bacillus subtilis* knockout mutants with and without flagella // J. Bacteriol. – 2003. – V. 185, No 13, – P. 3711–3717.

10. *Sharipova M., Balaban N., Kayumov A., Kirillova Y., Mardanova A., Gabdrakhmanova L., Leshchinskaya I., Rudenskaya G., Akimkina T., Safina D., Demidyuk I., Kostrov S.* The expression of the serine proteinase gene of *Bacillus intermedius* in *Bacillus subtilis* // Microbiol. Res. – 2008. – V. 163. – P. 39–50.

11. *Михайлова Е.О., Марданова А.М., Балабан Н.П., Руденская Г.Н., Шарипова М.Р.* Выделение и характеристика субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* AJ 73 на разных фазах роста бацилл // Биохимия. – 2007. – Т. 72, Вып. 2. – С. 228–235.

12. *Mikhailova E.O., Balaban N.P., Mardanova A.M., Rudakova N.L., Ilyinskaya O.N., Rudenskaya G.N., Rizvanov A.A., Sharipova M.R.* Purification of a subtilisin-like serine proteinase from recombinant *Bacillus subtilis* during different phases of growth // Ann. Microbiol. – 2009. – V. 59. No 2. – P. 301 – 307.

13. *Балабан Н.П., Марданова А.М., Шарипова М.Р., Габдрахманова Л.А., Соколова Е.А., Руденская Г.Н., Лещинская И.Б.* Очистка и характеристика сериновой протеиназы 2 *Bacillus intermedius* 3-19 // Биохимия. – 2004. – Т. 69, Вып. 4. – С. 519–526.

14. *Каюмов А.Р., Балабан Н.П., Марданова А.М., Костров С.В., Шарипова М.Р.* Биосинтез субтилизиноподобной сериновой протеиназы *Bacillus intermedius* в условиях солевого стресса // Микробиол. – 2006. – Т. 75, № 5. – С. 642–648.

15. *Sambrook J., Russell D.W., Irwin N., Janssen K.A.* LB medium recipe // Sambrook J., Russell D.W. (eds.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. – N. Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001. – V. 3, Ch. 18. – P. A 2.2.

16. *Sambrook J., Russell D.W., Irwin N., Janssen K.A*. Preparation and transformation of competent *E. coli* using calcium chloride. Protocol 25 // Sambrook J., Russell D.W. (eds.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. – N. Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001. – V. 1, Ch. 1. – P. 1.116–1.118.

17. *Chang S., Cohen S.N.* High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA // Mol. Gen. Genet. – 1979. – V. 168. – P. 1111–1115.

18. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – V. 227. – P. 680–685.

19. *Ицкович Е.Л., Балабан Н.П., Марданова А.М., Шакиров Е.В., Шарипова М.Р., Лещинская И.Б., Ксенофонтов А.Л., Руденская Г.Н.* Энзиматические свойства тиолзависимой сериновой протеиназы *Bacillus intermedius* // Биохимия. – 1997. – Т. 62, Вып. 1. – С. 60–65.

20. *Leshchinskaya I.B., Shakirov E.V., Itskovitch E.L., Balaban N.P., Mardanova A.M., Sharipova M.R., Viryasov M.B., Rudenskaya G.N., Stepanov V.M.* Glutamylendopeptidase of *Bacillus intermedius* strain 3-19 // FEBS Lett. – 1997. – V. 404. – P. 241–244.

21. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1983. – 221 с.

22. *Балабан Н.П., Шарипова М.Р., Ицкович Е.Л., Лещинская И.Б., Руденская Г.Н.* Секретируемая сериновая протеиназа спорообразующих бактерий *Bacillus intermedius* 3-19 // Биохимия. – 1994. – Т. 59, № 9. – С. 1393–1400.

23. *Шарипова М.Р., Балабан Н.П., Габдрахманова Л.А., Шилова М.А., Кадырова Ю.М., Руденская Г.Н., Лещинская И.Б.* Гидролитические ферменты и спорообразование у *Bacillus intermedius* // Микробиол. – 2002. – Т. 71, № 4. – С. 494–499.

24. *Kunst F., Rapoport G.* Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. – 1995. – V. 175, No 9. – P. 2403–2407.

25. *Verhamme D.T., Kiley T.B., Stanley-Wall N.R.* DegU co-ordinates multicellular behaviour exhibited by *Bacillus subtilis* // Mol. Microbiol. – 2007. – V. 65, No 2. – P. 554–568.

Поступила в редакцию
27.08.10

Тойменцева Анна Александровна – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.
E-mail: *TojmencevaAA@mail.ru*

Каримова Мадина Рустамовна – аспирант Института молекулярной клеточной биологии и генетики Макса Планка, г. Дрезден, Германия.
E-mail: *madinakarimova@mail.ru*

Ризванов Альберт Анатольевич – кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики Казанского (Приволжского) федерального университета.
E-mail: *rizvanov@gmail.com*

Шагимарданова Елена Ильясовна – кандидат биологических наук, инженер кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.
E-mail: *elenakazan@yahoo.com*

Шарипова Маргарита Рашидовна – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.
E-mail: *Margarita.Sharipova@ksu.ru*