УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ КАЗАНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА
Том 152, кн. 4 Естественные науки *2010*

УДК 579.22:577.21

ВЫДЕЛЕНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ, АКТИВИРУЮЩИХСЯ В УСЛОВИЯХ ОГРАНИЧЕННОГО РОСТА БАЦИЛЛ

А.М. Черёмин, А.А. Тойменцева, А.Р. Сабирова, А.Р. Каюмов, А.Б. Маргулис, М.Р. Шарипова

Аннотация

Регуляторные белки бацилл DegU, Spo0A и TnrA выделены и очищены из клеточных экстрактов рекомбинантных штаммов-продуцентов *E. coli* аффинной хроматографией на колонке с сефарозой, содержащей никель-нитрилотриуксусную кислоту (Ni-NTA). Проведена идентификация соответствующих регуляторных белков с помощью иммуноблоттинга с использованием специфических кроличьих антител против His-tag-последовательностей.

Ключевые слова: регуляторные белки, TnrA, DegU, Spo0A, экспрессионные векторы.

Введение

Для активации экспрессии многих генов, участвующих в адаптационных процессах, кроме σ-факторов РНК-полимеразы необходимы также факторы транскрипции. Белок DegU – мастер-регулятор системы сигнальной трансдукции DegS-DegU в клетках *B. subtilis* – в фосфорилированной форме активирует экспрессию генов внеклеточных ферментов деградации: протеиназ, амилаз, липаз и др. [1]. Нефосфорилированная форма DegU необходима для достижения клетками состояния компетентности [2]. Фактор транскрипции Spo0A регулирует комплексный процесс перехода бацилл к споруляции – финальный ответ микроорганизмов на голодание [3]. Фосфорилирование фактора Spo0A происходит по N-концевому домену белка, а C-концевой домен взаимодействует с консенсусной последовательностью нуклеотидов в промоторной области [4]. C-концевой домен белка Spo0A способен также связываться со Spo0A-боксом в промоторах генов, будучи в нефосфорилированной форме [5]. Фактор транскрипции TnrA в условиях азотного голодания активирует или подавляет экспрессию большого числа генов и оперонов [6].

Бактерии *Bacillus intermedius* в стационарной фазе роста активно секретируют сериновые протеиназы: субтилизиноподобную протеиназу AprBi и глутамилэндопептидазу GseBi [7, 8]. Уровень синтеза ферментов снижается в Deg-регуляторных мутантах *B. subtilis,* полностью подавлен в Spo0A-штаммах и отзывается на TnrA-регуляцию, что может служить косвенным доказательством участия этих систем в регуляции экспрессии генов протеиназ [9–11].

Целью настоящей работы являлось выделение и очистка регуляторных белков DegU, TnrA и Spo0A для исследования ДНК-белковых взаимодействий с промоторами генов протеиназ *B. intermedius.*

1. Материалы и методы исследования

В работе использовали плазмиду pMF14, несущую фрагмент гена Spo0A из генома *B. subtilis*, который кодирует С-концевой домен белка Spo0A, участвующий во взаимодействии с ДНК, а также содержащий последовательность, соответствующую шести гистидинам (His-tag) на N-конце. Плазмида pMF14 содержит ген устойчивости к ампициллину и была любезно предоставлена для работы профессором Ричардом Лозиком (Гарвардский университет, Кэмбридж) [5]. Экспрессионный вектор pTYB-degU несет рекомбинантный ген белка DegU с шестью остатками гистидина на N-конце, а также ген устойчивости к ампициллину. Плазмида предоставлена для работы профессором К. Цукахара (Институт океанических исследований, Токио) [12]. Плазмида pET15b-TnrA, несущая ген регуляторного белка TnrA и штамм-реципиент плазмид *E. coli BL21* любезно предоставлены профессором К. Форшхаммером (Университет г. Тюбингена, Германия).

Для культивирования бактерий использовали среду Лоури – Бертони (LB) [13]. Культивирование проводили в колбах объемом 100 и 1000 мл при соотношении объема 1 : 7.5 на лабораторных качалках с интенсивностью качания 200 об/мин. Клетки *E. coli* выращивали при температуре 37 °С с добавлением антибиотика в конечной концентрации 1 мМ. В качестве инокулята использовали 16-часовую культуру, выращенную на среде LB. Контроль за ростом культуры осуществляли, определяя изменение оптической плотности ($D_{опт}$) культуры, нефелометрически на ФЭК-56М с красным светофильтром (590 нм), а также на планшетном фотометре «iEMS-Reader» (Labsystems, Финляндия, Thermo Fisher Scientific Inc.), в программе «Микроб-автомат». Для снятия репрессии lac-оператора и индукции гиперэкспрессии целевого белка к культуре клеток, находящихся в экспоненциальной фазе роста ($ОП_{590} = 0.6$), добавляли IPTG до конечной концентрации 1 мМ. После этого клетки выращивали 4–6 ч для получения целевого белка и собирали центрифугированием.

Клеточный лизат получали путем механического растирания клеточной биомассы с добавлением буфера L (50 мМ ТрисHCl, pH 8.0; 0.3% KCl; 2 мМ PMSF). Полученный лизат центрифугировали 15 мин при 4000 об/мин. Супернатант, полученный в результате разрушений, центрифугировали 10 мин при 13000 об/мин и использовали для дальнейшей работы.

Очистку регуляторных белков DegU, TnrA и Spo0A проводили методом афинной хроматографии на Ni-NTA-колонке фирмы Sigma (США). Клеточный лизат наносили со скоростью 0.5 мл/мин на колонку, уравновешенную буфером А (20 мМ Трис HCl, pH 8.0; 400 мМ NaCl; 20 мМ имидазол) и промывали буфером А до снижения поглощения элюата при длине волны $\lambda = 280$ до значения 0.01. Белок элюировали буфером В (20 мМ Трис HCl, pH 8.0; 400 мМ NaCl; 250 мМ имидазол) при скорости 0.5 мл/мин.

Количество белка в растворе определяли спектрофотометрически, измеряя поглощение раствора при длинах волн 260 и 280 нм, а также методом Брэдфорд [14].

Концентрацию белка подсчитывали по формуле: $C_{белка}$ (мг/мл) = $1.55 \cdot A_{280} - 0.76 \cdot A_{260}$, где A_{280} – поглощение света при 280 нм, A_{260} – поглощение света при 260 нм.

Степень чистоты полученных препаратов и их молекулярную массу определяли методом электрофореза, который проводили в 15%-ном ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-Na) [15].

Идентификацию белков Spo0A, DegU и TnrA проводили методом иммуноблоттинга [16]. Для постановки метода использовали кроличьи антитела к последовательности из шести гистидинов на *N*-концах белков. После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану, предварительно смоченную водой и наносили на фильтры, смоченные в буферах для анода I и II, затем на мембрану помещали гель и фильтры с буфером для катода III. Электроблоттинг проводили при 30 мА в течение 30 мин. Для определения эффективности переноса белков на мембрану использовали метод обратимого окрашивания с помощью раствора PSS (Ponceau S staining solution). После появления картинки промывали мембрану водой несколько раз.

Буфер для анода I – 300 мМ Tris-HCl, 96%-ный этанол. Буфер для анода II – 25 мМ Tris-HCl, 96%-ный этанол. Буфер для катода III – 25 мМ Tris-HCl, 96%-ный этанол, 40 мМ аминокапроновая кислота. Раствор PSS – 2% Ponceau S, 3%-ная трихлоруксусная кислота, 3%-ная сульфосалициловая кислота.

Для предотвращения неспецифического связывания антител мембрану обрабатывали 5%-ным раствором обезжиренного молока в TBS (Tris based solution) в течение 1 ч с интенсивностью качания 50 об/мин. Затем мембрану помещали в 1%-ный раствор молока в TBS, вносили антитела против исследуемого белка и инкубировали при +4 °С в течение ночи, после этого трижды отмывали в TBS-буфере по 5 мин. Далее инкубировали в 1%-ном растворе молока в TBS, содержащем антитела против антител кролика, коньюгированные с пероксидазой (Sigma, США), в течение 1.5 ч при 50 об/мин. После этого трижды отмывали в TBS-буфере по 5 мин. Для проявления мембраны обрабатывали в равном соотношении растворами ECL1 и ECL2 и инкубировали в течение 20 мин с рентгенографической пленкой (ООО «НПП «Тасма», г. Казань), затем фотопленку переносили в раствор проявителя (ООО «НПП «Тасма», г. Казань), далее в раствор закрепителя (ООО «НПП «Тасма», г. Казань).

TBS – 20 мМ Tris-HCl (pH 7.4), 9 г/л NaCl. ECL1 – 2.5 мМ люминол, 0.4 мМ паракумаровая кислота, 100 мМ Tris-HCl (pH 8.5). ECL2 – 5.4 мМ H_2O_2, 100 мМ Tris-HCl (pH 8.5).

Анализ последовательности проводили с помощью алгоритма BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) [17].

2. Результаты и их обсуждение

В промоторной области генов *aprBi* и *gseBi*, последовательность которых установлена ранее [ANY15136; ANAY754946], проводили поиск и идентифицировали участки с высокой гомологией (до 80%) к последовательностям для специфического взаимодействия с регуляторными белками DegU (AGAA N_{11-13} TTCAG) и Spo0A (TGNCGAA) (рис. 1).

aprBi

gaatggaaggtccttgattacaacgtggtcagccatttactccatcctccccttt
taa**agaa**cctgttattgt**aacag**gttnttttnaatgccaaaaccaaaaaataata
tttttttatatcgaaattcga**aata**gatgctagacgt**ttcta**cctattttaaggct
tttcgggtatcgaatatttgtccgaaaatggatcata**agaa**aaaaagcacac**ttcc**
ttttt**aata**gataaccgctga**aacag**cagaaca**aaca**tattttcccaacgt**ttcca**
agtgacttaattccccaattttcgct**agga**ctttcacaaaaa**ttcgg**gtctactct
tattttgcctacttcccttaaac**tgaa**tatacagaatta**atc**aaacgaatcattctta
t**aga**ctacgaatgatta**ttctg**aaataagaaaaaagggatgtggattgtgc***gtg***aa
aaagaaaaatgtgatg

gseBi

cactaggcgaagctcacctgtattttggctgtcgtcaccctcttgaagatgatc**tg**
tatttgaggaaa**tgcag**cttgc**agcg**caaaaaggagttg**ttcac**atccaccgggc
ttattctcgtcacaa**agag**caaaaagtatatg**tccag**cattttgttga**aa**ga**ga**agacg
gcggca**tgctg**atcaagttacttgaccaaggtgggtatctttacgtgtgcggggac
ggaaaagttatggcaccagacgtagaggctacgcttatcgacctctatcaaaacgag
aaacattgctcgaaggaaacagctgaaaattggctgacaacccttgcaaatgacaat
agatatgtaaaagatgtgtggagctgaaaaattaggaagaccgccaatt**aggc**ggtt
ttttctat**ttcat**agagagagatcaatagaatgaaggttggaaagatacaaaacacc
taatttaaaaatgaaatattttg**taaa**aaataagaata**ttctc**tcatttactccaat
atgaaacaatcgtatgatttttgatataggacataaaggaggaatatg***atg***

Рис. 1. Последовательности промоторной области генов субтилизиноподобной протеиназы (*aprBi*) и глутамилэндопептидазы (*gseBi*) *B. intermedius*. Сайты связывания с регуляторным белком Spo0A выделены рамками, с регуляторным белком DegU подчеркнуты, канонические последовательности в пределах DegU-бокса выделены. Инициирующий кодон выделен курсивом и подчеркнут

Эти последовательности расположены в виде прямых тандемных повторов на протяжении 460 п.о. Характерной особенностью расположения этих участков в регуляторной области генов субтилизиноподобных протеиназ является тот факт, что Spo0A-боксы располагаются близко или частично перекрываются с последовательностями для связывания с белком DegU. Этот факт позволяет предположить, что обе системы не могут одновременно участвовать в регуляции экспрессии генов протеиназ и активируются в ответ на различные стрессовые условия.

В промоторе гена субтилизиноподобной протеиназы *aprBi* нами обнаружено 10 участков ДНК с высокой гомологией к Spo0A-консенсусам и 8 участков с высокой гомологией к DegU-боксам. В промоторе гена *gseBi* выявлено 4 сайта с высокой гомологией к Spo0A и 6 высокогомологичных участков к DegU. В то же время не обнаружено консенсусных последовательностей для TnrA-белка, что позволяет использовать этот белок в качестве отрицательного контроля при изучении взаимодействия с промотором.

Для изучения взаимодействия факторов транскрипции с промоторами генов протеиназ регуляторные белки выделяли и очищали до гомогенного со-

стояния. Для этого использовали рекомбинантные штаммы *E. coli*, характеризующиеся суперпродукцией Spo0A, TnrA и DegU регуляторных белков.

Все используемые в работе экспрессионные системы содержали промотор бактериофага T7 [18, p. 322–323.]. Активация промотора осуществлялась специфичной T7 РНК-полимеразой бактериофага. Ген T7 РНК-полимеразы был интегрирован в хромосому клетки хозяина в lac-оперон, регулируемый индуктором IPTG. Такая экспрессионная система обеспечивает суперпродукцию целевого белка с промотора фага T7, специфически активируемого индуцибельной T7 РНК-полимеразой [19] (рис. 2).

В этом случае внесение индуктора – лактозы или ее синтетического аналога IPTG – снимает репрессию lac-оперона на хромосоме и на векторе. Начинается синтез T7-РНК полимеразы, которая транскрибирует ген целевого белка на плазмиде. Благодаря высокой эффективности T7 РНК-полимеразы через 4–6 ч целевой белок становится доминирующим белковым компонентом клетки.

В работе мы использовали векторы, которые позволили провести клонирование генов DegU-, TnrA- и Spo0A-белков с последовательностями из шести гистидинов. Такие белки обладают способностью специфически связываться с ионами никеля, что дает возможность применить для очистки белков аффинную хроматографию. Сорбент содержит аминополикарбоновую нитрилотриуксусную кислоту, которая способна образовывать устойчивые растворимые комплексы с ионами металлов, в данном случае с ионами Ni. His-tag-последовательности рекомбинантных белков прочно связывались с ионами Ni, что позволило использовать процедуру аффинной хроматографии для селективной сорбции исследуемых белков.

Плазмиды pMF14, pET15b-TnrA и pTYB-DegU были трансформированы в бесплазмидный лабораторный штамм *E. coli BL21*. В результате скрининга трансформантов на среде с антибиотиком (ампициллином) были отобраны клоны *E. coli BL21* pTYB-DegU, *E. coli BL21* pET15b-TnrA и *E. coli BL21* pMF14, которые использовали для получения и очистки белков DegU, TnrA и Spo0A.

Проводили сравнительное изучение динамики роста рекомбинантных и бесплазмидного штаммов. Для определения потребления субстрата штаммами *E. coli BL21* pTYB-DegU, *E. coli BL21* pMF14 и *E. coli BL21* pET15b-TnrA использовали планшетный фотометр iEMS-Reader. Бесплазмидный штамм *E. coli BL21* служил в качестве контроля (рис. 3).

Полученные данные показали, что приращение оптической плотности штаммов-продуцентов рекомбинантных белков по сравнению с контролем начинает уменьшаться на 10-й час роста, что свидетельствует о наличии в них дополнительной генетической информации в виде рекомбинантных векторов, требующих дополнительных ресурсов источников питания для поддержания жизнедеятельности бактерий. В отличие от штаммов-продуцентов, бесплазмидный штамм переходит в стационарную фазу позднее – на 16-й час роста. Как следует из рис. 3, вплоть до 18-го часа оптическая плотность растет, тогда как у штаммов-продуцентов снижается после 8–10 ч культивирования.

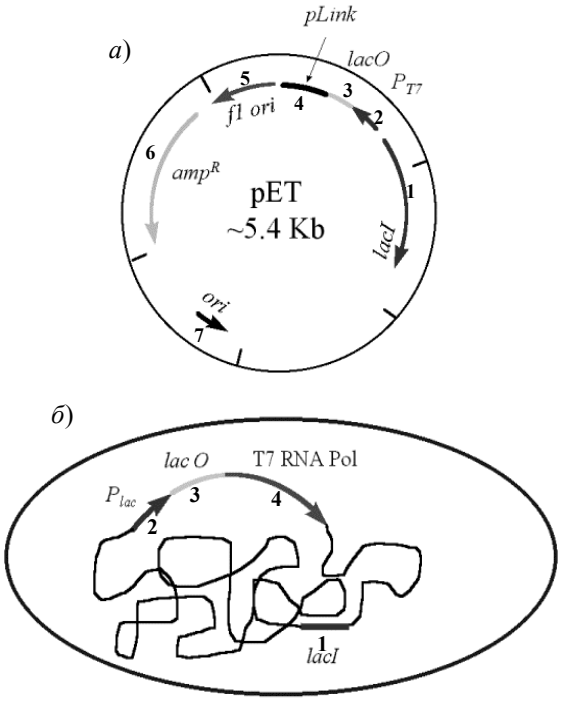

Рис. 2. Схема pET вектора экспрессии (*а*): 1 – ген *lacI;* 2 – T7-промотор; 3 – lac-оператор; 4 – полилинкерный сайт. 5 – фаговый сайт инициации репликации; 6 – ген устойчивости к антибиотику (ампициллин); 7 – сайт инициации репликации *E. coli.* Хромосома штамма реципиента (*б*): 1 – ген *lacI*, 2 – lac-промотор, 3 – lac-оператор; 4 – открытая рамка считывания гена T7 РНК полимеразы с терминатором, интегрированным в хромосому клетки-хозяина

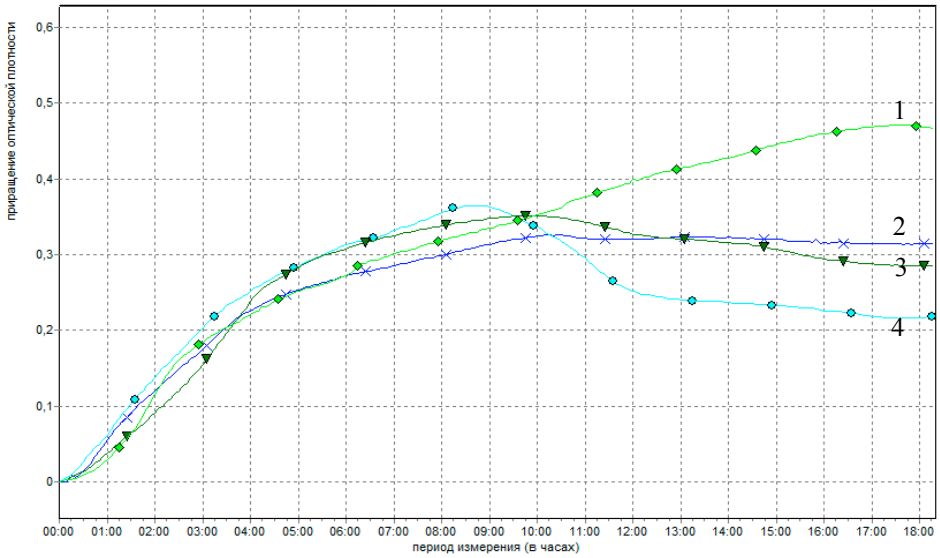

Рис. 3. Кривые роста бесплазмидного (1) *E. coli BL21* и рекомбинантных штаммов: 2 – *E. coli BL21* pMF14, 3 – *E. coli BL21* pET15b-TnrA, 4 – *E. coli BL21* pTYB-DegU

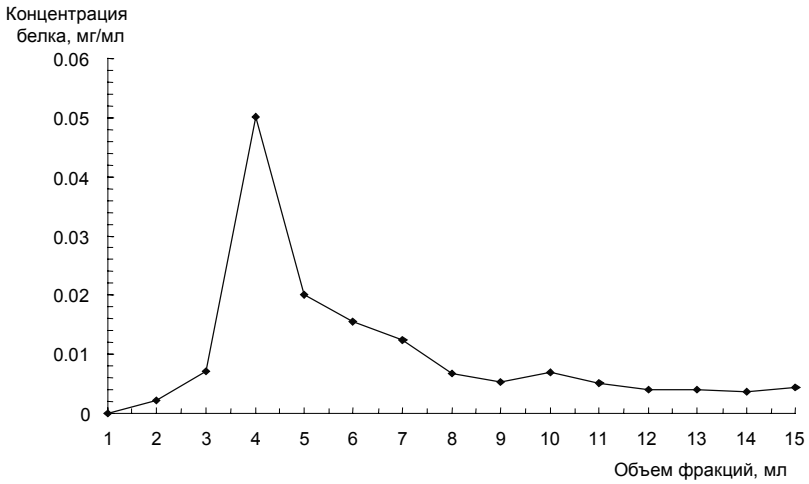

Рис. 4. Профиль элюции белка DegU с Ni-NTA-колонки

Табл. 1

Очистка белка Deg U при помощи хроматографии на Ni-NTA-сефарозе

Стадии очистки	Концентрация белка, мг/мл	Общее количество экстракта/элюата, мл	Общее количество белка, мг	Степень очистки белка	Выход белка, %
Клеточный экстракт	7	15	105	1	100
Хроматография на Ni-NTA сефарозе	0.009	15	0.13	807	0.12

Клетки рекомбинантных штаммов *E. coli BL21* pTYB-DegU, *E. coli BL21* pET15b-TnrA и *E. coli BL21* pMF14 выращивали на среде LB. После индукции IPTG клетки разрушали и проводили выделение целевых белков из клеточных лизатов путем аффинной хроматографии.

Клеточные экстракты рекомбинантного штамма *E. coli BL21* pTYB-DegU подвергали очистке путем хроматографии на колонке с Ni-NTA-сефарозой. В этих условиях при нанесении экстракта на колонку сорбция на сефарозе составила не более чем 2%, что свидетельствует о селективности процесса. При промывке буфером А до поглощения $A_{280} = 0.01$ белок не элюировал с колонки. Элюцию белка осуществляли буфером В с повышенной концентрацией имидазола. В процессе элюции получали один белковый пик (рис. 4).

Белок элюировал с колонки в объеме 5 мл с содержанием 0.02 мг по белку. В результате одноступенчатой хроматографии белок очищен в 807 раз, выход DegU в процессе очистки составил 0.12%. (табл. 1). Степень чистоты препарата тестировали электрофорезом в 15% полиакриламидном геле (рис. 5).

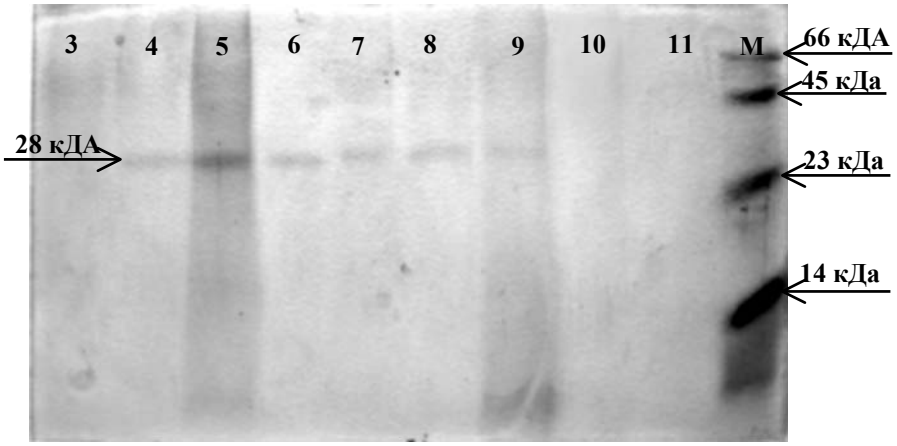

Рис. 5. Электрофорез фракций, содержащих DegU белок, после элюции с Ni-NTA-сефарозы (дорожки 3–10), М – стандарты молекулярной массы

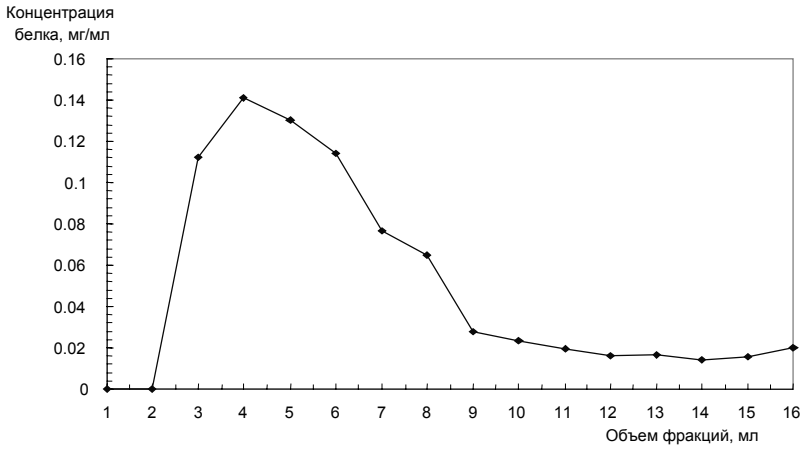

Рис. 6. Профиль элюции белка Spo0A с Ni-NTA-колонки

На рисунке видно, что очищенный препарат после электрофореза представлен в виде единственной белковой полосы с молекулярной массой 28 кДа, что соответствует ожидаемой молекулярной массе белка, рассчитанной по аминокислотной последовательности. Таким образом, в результате очистки мы получили хроматографически и электрофоретически гомогенный препарат для ДНК-белкового взаимодействия.

Экстракты рекомбинантного штамма *E. coli BL21* pMF14, продуцирующего бациллярный фактор транскрипции Spo0A, подвергали хроматографии аналогично штамму *E. coli BL21* pTYB-DegU. После сорбции белок элюировал с колонки в объеме 6 мл с содержанием 0.1 мг (рис. 6).

В результате хроматографии белок был очищен в 65 раз, выход Spo0A-белка составил 1.5% (табл. 2).

Степень чистоты препарата тестировали электрофорезом в 15%-ном полиакриламидном геле (рис. 7).

Табл. 2

Очистка белка Spo0A при помощи хроматографии на Ni-NTA-сефарозе

Стадии очистки	Концентрация белка, мг/мл	Общее количество экстракта/элюата, мл	Общее количество белка, мг	Степень очистки белка	Выход белка, %
Клеточный экстракт	7	15	105	1	100
Хроматография на Ni-NTA-сефарозе	0.1	16	1.6	65	1.5

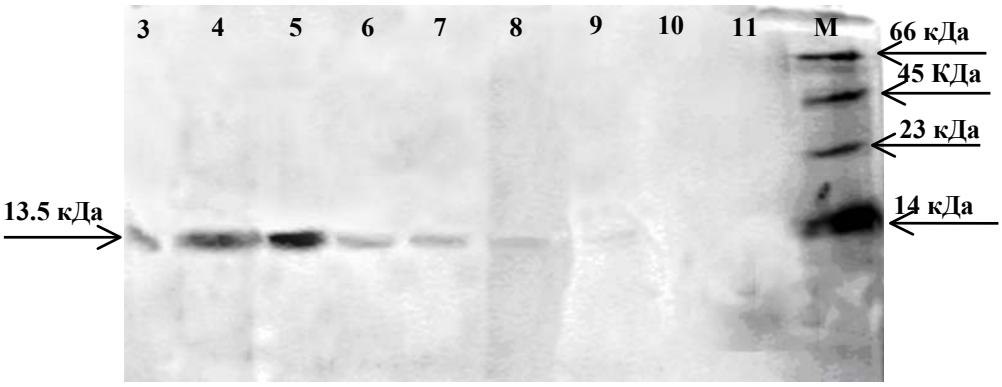

Рис. 7. Электрофорез фракций, содержащих Spo0A белок, после элюции с Ni-NTA-сефарозы (дорожки 3–11), М – стандарты молекулярной массы

На рисунке видно, что очищенный препарат после электрофореза представлен одной белковой полосой с молекулярной массой 13.5 кДа, что соответствует молекулярной массе С-домена белка Spo0A, предназначенного для взаимодействия с ДНК [5]. Таким образом, в результате проведения аффинной хроматографии мы получили хроматографически и электрофоретически гомогенный препарат для исследования ДНК-белкового взаимодействия с промоторной областью гена.

Экстракты рекомбинантного штамма *E. coli BL21* pET15b-TnrA подвергали хроматографии аналогично штаммам *E. coli BL21* pMF14 и *E. coli BL21* pTYB-DegU. Профиль элюции представлен на рис. 8. В результате одноступенчатой хроматографии белок был очищен в 31 раз, выход TnrA белка составил 3.2% (табл. 3). Фракции элюата собирали и анализировали с помощью электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле (рис. 9).

На рисунке видно, что очищенный препарат после электрофореза представлен в виде единственной белковой полосы с молекулярной массой 16 кДа. Таким образом, в результате очистки мы получили хроматографически и электрофоретически гомогенный препарат для ДНК-белкового взаимодействия.

Идентификацию соответствующих регуляторных белков в полученных препаратах проводили с помощью иммуноблоттинга с использованием специфических кроличьих антител против His-tag-последовательностей (рис. 10).

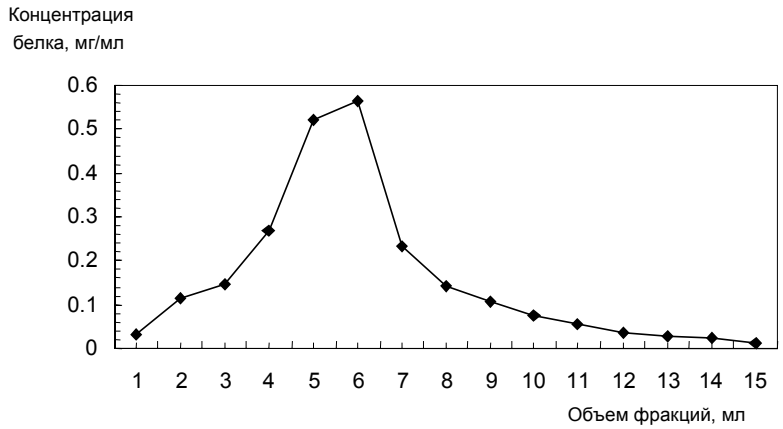

Рис. 8. Профиль элюции белка TnrA с Ni-NTA-колонки

Табл. 3

Очистка белка TnrA при помощи хроматографии на Ni-NTA-сефарозе

Стадии очистки	Концен-трация белка, мг/мл	Общее коли-чество экс-тракта/ элюата, мл	Общее ко-личество белка, мг	Степень очистки белка	Выход белка, %
Клеточный экстракт	7.5	15	112.5	1	100
Хроматография на Ni-NTA-сефарозе	0.24	15	3.6	31	3.2

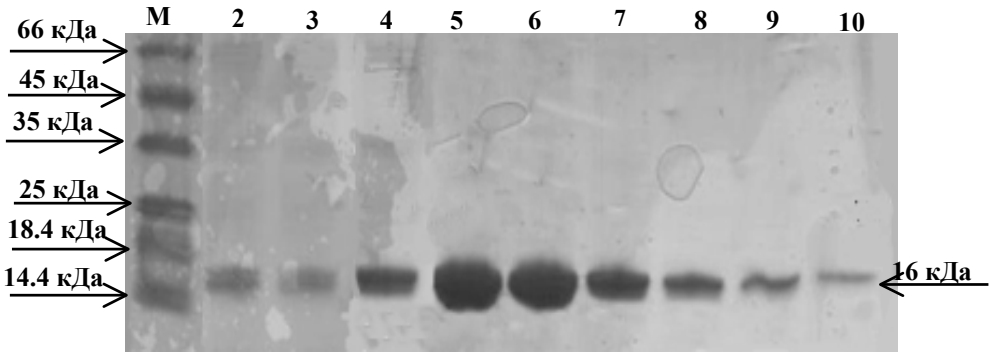

Рис. 9. Электрофорез фракций, содержащих TnrA-белок, после элюции с Ni-NTA-сефарозы (дорожки 2–10), M – стандарты молекулярной массы

На рисунке представлен результат, полученный для TnrA-белка. Аналогичные результаты получены для белков DegU и Spo0A, что свидетельствует о получении целевых белков, которые предназначены для изучения взаимодействия с ДНК-промоторными областями клонированных генов протеаз *B. intermedius.*

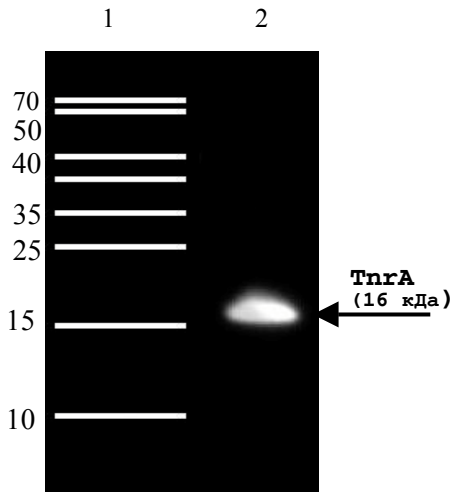

Рис. 10. Вестерн-блотт анализ клона *E. coli Bl-21* pET15b-TnrA: 1 – стандарт молекулярной массы; 2 – иммуноблоттинг с антителами к His-Tag

Заключение

Белки регуляторных систем взаимодействуют с ДНК, активируя либо подавляя экспрессию генов. Для исследования взаимодействия регуляторных белков с промоторной ДНК in vitro очистка нативных белков из клеток невозможна ввиду их малой концентрации. Использование экспрессионных систем позволяет наработать достаточное количество целевого белка, а конструирование рекомбинантных белков, несущих аффинную метку, делает возможной их очистку методом аффинной хроматографии в одну стадию и получение при этом высокоочищенного белка.

В результате проделанной работы нами получены регуляторные белки Spo0A, DegU и TnrA в количестве 1.6, 0.13 и 3.6 мг соответственно, необходимые для исследования их взаимодействия с промоторами генов внеклеточных протеиназ *B. intermedius*.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов: РФФИ (проект № 09-04-99044), Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (ГК № П.344), Аналитической ведомственной целевой Федеральной программы (РНП 2.11.1005).

Summary

A.M. Cheremin, A.A. Toymentseva, A.R. Sabirova, A.R. Kayumov, A.B. Margulis, M.R. Sharipova. Isolation of Regulatory Proteins Activated under Limited Growth Conditions of Bacilli.

Bacillus subtilis regulatory proteins DegU, Spo0A and TnrA were isolated and purified from cell lysates of *E. coli* recombinant strains by affinity chromatography on a column with nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA). The identification of corresponding regulatory proteins was carried out via immunoblotting analysis using specific rabbit antibodies targeting the His-tag sequences.

Key words: regulatory proteins, TnrA, DegU, Spo0A, expression vectors.

Литература

1. *Msadek T., Kunst F., Henner D., Klier A., Rapoport G., Dedonder R.* Signal transduction pathway controlling synthesis of a class of degradative enzymes in *Bacillus subtilis*: expression of the regulatory genes and analysis of mutations in *degS* and *degU* // J. Bacteriol. – 1990. – V. 172, No 2. – P. 824–834.
2. *Kunst F., Rapoport G.* Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. –1995. – V. 177, No 9. – P. 2403–2407.
3. *Hoch J.A. spo0* genes, the phosphorelay, and the initiation of sporulation // *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics / By ed. A.L. Sonenshein, J.A. Hoch, R. Losick. – Washington D.C.: Amer. Soc. for Microbiol., 1993. – P. 747–755.
4. *Ireton K., Rudner D.Z., Siranosian K.J., Grossman A.D.* Integration of multiple developmental signals in *Bacillus subtilis* through the Spo0A transcription factor // Genes Dev. – 1993. – V. 7, No 2. – P. 283–294.
5. *Losick R., Fujita M., Gonzalez-Pastor J.E.* High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis* // J Bacteriol. – 2005. – V. 187, No 4. – P. 1357–1368.
6. *Wray L.V., Ferson A.E., Rohrer K., Fisher S.H.* TnrA, a transcription factor required for global nitrogen regulation in *Bacillus subtilis* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – V. 93, No 17. – P. 8841–8845.
7. *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.
8. *Балабан Н.П., Марданова А.М., Шарипова М.Р., Габдрахманова Л.А., Соколова Е.А., Гарусов А.В., Милготина Е.И., Руденская Г.Н., Лещинская И.Б.* Получение и характеристика глутамилэндопептидазы 2 *Bacillus intermedius* 3-19 // Биохимия. – 2003. – Т. 68, Вып. 11. – С. 1514–1521.
9. *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. 557–563.
10. *Sharipova M.R., Chastukhina I.B., Shagimardanova E.I., Shamsutdinov T.R., Balaban N.P., Mardanova A.M., Rudenskaya G.N., Demiduk I.V., Kostrov S.V.* The expression of *Bacillus intermedius* glutamyl endopeptidase gene in *Bacillus subtilis* recombinant strains // Mol. Biol. Rep. – 2007. – V. 34, No 2. – P. 79–87.
11. *Sharipova M., Balaban N., Kayumov A., Kirillova Y., Gabdrakhmanova L., Mardanova A., 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, No 1. – P. 39–50.
12. *Tsukahara K., Ogura M.* Promoter selectivity of the *Bacillus subtilis* response regulator DegU, a positive regulator of the *fla*/*che* operon and *sacB* // BMC Microbiol. – 2008. – V. 8, No 8. – URL: http://www.biomedcentral.com/1471-2180/8/8, свободный.
13. *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.
14. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – V. 72, No 7. – P. 248–254.
15. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – V. 227, No 5259. – P. 680–685.

16. *Burnette W.N.* Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A // Anal. Biochem. – 1981. – V. 112, No 2. – P. 195–203.
17. *Altschul S.F., Madden T.L., Schaumluffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucleic. Acids Res. – 1997. – V. 25, No 17. – P. 3389–3402.
18. *Purves W., Heller H., Orians G., Sadava D.* Life: the science of biology. – Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc., 2001. – 1100 p.
19. *Unger T.F.* Show Me The Money: Prokaryotic Expression Vectors and Purification Systems // The Scientist. – 1997. – V. 11, No 17. – URL: http://f1000scientist.com/article/display/17700/0901_1t0.pdf, свободный.

Поступила в редакцию
09.08.10

Черёмин Андрей Михайлович – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.
E-mail: *andrey4eremin@mail.ru*

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

Сабирова Альбина Рушановна – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.
E-mail: *albina-12@mail.ru*

Каюмов Айрат Рашитович – кандидат биологических наук, ассистент кафедры генетики Казанского (Приволжского) федерального университета.
E-mail: *kairatr@yandex.ru*

Маргулис Анна Борисовна – кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.
E-mail: *Anna.Margulis@ksu.ru*

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