

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *BACILLUS SUBTILIS* 168, НЕСУЩЕГО ШАТТЛ-ВЕКТОР С ГЕНОМ РИБОНУКЛЕАЗЫ *BACILLUS LICHENIFORMIS* ATCC 14580

Сокуренко Ю. В., Ульянова В. В., Ильинская О. Н.

ФГАОУВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Казань, Россия

РНКазазы находят применение в генной инженерии, молекулярной биологии и биотехнологии. Перспективный аспект использования микробных РНКаз связан с лечением опухолей и вирусных инфекций. В данной работе был получен штамм *Bacillus subtilis* 168, несущий ген РНКазы *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 и ее ингибитора на плазмиде, и показано, что РНКазы *B. licheniformis* эффективно синтезировались в рекомбинантном штамме. Полученная система на основе рекомбинантного штамма *B. subtilis* позволит установить механизмы регуляции экспрессии малоизученной РНКазы *B. licheniformis* с целью дальнейшего целенаправленного воздействия на продукцию фермента.

Ключевые слова: рибонуклеазы, бациллы, рекомбинантный штамм, шаттл-вектор.

Актуальность и цель работы. Рибонуклеазы являются важными ферментами метаболизма РНК. Они находят применение в генной инженерии, молекулярной биологии и биотехнологии. Перспективный аспект использования микробных РНКаз связан с лечением раковых опухолей и вирусных инфекций.

Эндоспорообразующие непатогенные грамположительные бактерии *Bacillus licheniformis* широко используются для крупномасштабного производства экзоферментов (протеаз, α -амилаз, пенициллиназ, ксиланаз) и пептидных антибиотиков [1]. Вместе с тем до сих пор в литературе практически нет сведений о наличии внеклеточных РНКаз у этого вида бацилл. С помощью средств биоинформатики в геноме *B. licheniformis* ранее нами была обнаружена последовательность, имеющая сходство с генами низкомолекулярных гуанилспецифичных РНКаз *B. amyloliquefasciens* (барназы) и *B. pumilus* (биназы). По результатам сравнительного анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей низкомолекулярная РНКазы *B. licheniformis* не может быть отнесена ни к группе барназоподобных, ни к группе биназоподобных РНКаз. Исследование свойств новой РНКазы и выяснение механизмов регуляции экспрессии ее гена имеют важное фундаментальное и практическое значение. В связи

с этим целью данной работы стало получение рекомбинантного штамма *B. subtilis*, несущего шаттл-вектор с генами внеклеточной низкомолекулярной РНКазы *B. licheniformis* и ее внутриклеточного ингибитора.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы *B. licheniformis* ATCC 14580, *Escherichia coli* DH5 α и *B. subtilis* 168. Для получения рекомбинантных конструкций были использованы плазмиды рВР (~ 3,2 тыс. п.о.) и рUB110 (~ 4,5 тыс. п.о.).

Фрагмент геномной ДНК *B. licheniformis* ATCC 14580, содержащий гены РНКазы и ее ингибитора, был амплифицирован с помощью ПЦР с использованием пары праймеров Bli-For (gagtgagaattcggcgcaaaaggaactttacc) и Bli-Rev (cagtacaagcttacgaaagaggatgtgaatgc). Плаزمиды рВР были рестрицированы по сайтам HindIII и EcoRI, после чего фрагмент большего размера (около 2,2 тыс. п.о.) был выделен и очищен из агарозного геля. Полученный фрагмент плазмидной ДНК лигировали с очищенным ПЦР продуктом, также предварительно рестрицированным по сайтам HindIII и EcoRI. Лигазной смесью был трансформирован штамм *E. coli* DH5 α . Выделенная из рекомбинантного штамма *E. coli* плазмиды и вектор рUB110 были рестрицированы по сайту EcoRI, очищены из агарозного геля и лигиро-

ваны. Полученной генетической конструкцией трансформировали штамм *B. subtilis* 168.

Результаты. Гены низкомолекулярной РНКазы *B. licheniformis* ATCC 14580 и ее природного ингибитора были амплифицированы с геномной ДНК. Был получен фрагмент размером 1,134 тыс. п.о.

Важным этапом в изучении свойств РНКазы *B. licheniformis* является создание генно-инженерной конструкции, содержащей ген исследуемой РНКазы. Для этого на первом этапе было проведено клонирование амплифицированного фрагмента в штамм *E. coli* DH5 α . В качестве вектора для клонирования была выбрана плаزمида pVP. Содержащийся в ней полный ген РНКазы *B. pumilus* мы заменили на амплифицированный фрагмент генома *B. licheniformis*, содержащий гены РНКазы и ее ингибитора. Полученной конструкцией были трансформированы компетентные клетки *E. coli* DH5 α .

Вторым этапом клонирования стало получение шаттл-вектора, несущего ген РНКазы *B. licheniformis*, для его экспрессии в клетках *B. subtilis*. Шаттл-вектор был сконструирован путем комбинации полученной конструкции с плазмидным вектором pUB110, необходимым для экспрессии чужеродных генов в *B. subtilis*.

В результате была получена плаزمида размером около 8 тыс. п.о. Полученной плазмидой был трансформирован штамм *B. subtilis* 168.

Обсуждение. Нами был получен штамм *B. subtilis* 168, несущий на плазмиде ген РНКазы *B. licheniformis* ATCC 14580 и ген ее внутриклеточного ингибитора. Показано, что РНКазы *B. licheniformis* эффективно синтезировалась в рекомбинантном штамме. Таким образом, на основе бактерии *B. subtilis* мы получили

систему, экспрессирующую малоизученную РНКазу *B. licheniformis* ATCC 14580. В дальнейшем мы планируем встроить полученную конструкцию в штаммы *B. subtilis*, дефектные по различным регуляторным белкам, для изучения механизмов регуляции новой низкомолекулярной РНКазы. Несмотря на то, что виды *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. subtilis* являются близкородственными и имеют сходные регуляторные системы, регуляторные механизмы, контролирующие продукцию гомологичных ферментов, у них различаются. Так, синтез барназы, в отличие от биназы, не подвержен влиянию неорганического фосфата и зависит от ключевого многофункционального белка стационарной фазы роста Spo0A [2]. Знание молекулярных механизмов регуляции синтеза РНКазы позволит осуществлять целенаправленное воздействие на ее продукцию. Для этого нами будет разработана система экспрессии на основе бациллярных штаммов, так как она имеет ряд преимуществ перед системами на основе *E. coli*, основные недостатки которых заключаются, в первую очередь, в наличии экзотоксина и в низкой секреции белков [3, 4].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Waschkau B., Waldeck J., Wieland S., Eichstädt R., Meinhardt F. Appl Microbiol Biotechnol 2008, 78, 181-188.
2. Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O. FEBS Journal 2011, 278, 3633-3643.
3. Demain A., Vaishnav P. Biotechnol Advances 2009, 27, 297-306.
4. Schallmeyer M., Singh A., Ward O. Can J Microbiol 2004, 50, 1-17.

OBTAINING OF RECOMBINANT STRAIN OF *BACILLUS SUBTILIS* 168 CARRYING THE SHUTTLE VECTOR WITH THE GENE OF RNASE OF *BACILLUS LICHENIFORMIS* ATCC 14580

Sokurenko Yu.V., Ulyanova V.V., Ilinskaya O.N.

Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

RNases are used in genetic engineering, molecular biology and biotechnology. The promising aspect of the use of microbial RNases is associated with the treatment of tumors and viral infections. We obtained the strain of *Bacillus subtilis* 168, carrying the gene of RNase of *B. licheniformis* ATCC 14580 and its inhibitor on the plasmid. It was shown that RNase of *B. licheniformis* was efficiently synthesized in the recombinant strain. The system based on recombinant strain of *B. subtilis* will allow to establish the mechanisms of regulating of the expression of insufficiently explored RNase of *B. licheniformis* for the purpose of further targeted impact on the production of enzyme.