

264, 309-311, 1989.

28. *Vikmon M.* In: Proceedings of the first international symposium on cyclodextrins (Szejtli, J., ed.), D.Reidel, Budapest, 69-74, 1982.  
 29. *Villette J.R., Sicard P.J., Bouquetlet S.J.-L.* Biotechnol. Appl. Biochem., 15, 69-79, 1992.

Поступила 10.V.97

Биолог. журн. Армении. 3-4 (50), 1997

УДК 579.871.579.253.4

**ПЕРЕНОС И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ФЭП-КАРБОКСИЛАЗЫ  
 ESCHERICHIA COLI В КЛЕТКАХ КОРИНЕФОРМНЫХ БАКТЕРИЙ**

Н.А. ОГАНЕСЯН, М.Г. ГЕВОРКЯН, М.Б. ЧИТЧЯН, Э.Л. АГАБЕКЯН,  
 Г.Г. ОГАПЕЗОВА, С.В. КАЖОЯН, Н.С. АВЕТИСЯН, В.А. САКАНЯН

НИИ "Биотехнология", 375054, Ереван

Сконструирована гибридная плазмида рРС6, содержащая ген ФЭП-карбоксилазы *Escherichia coli* и способная реплицироваться в клетках коринеформных бактерий. Методом электропорации получены трансформанты *Brevibacterium flavum* и *Brevibacterium lactofermentum*, содержащие плазмиду рРС6. В клетках полученных трансформантов активность ФЭП-карбоксилазы повышается почти в два раза. В условиях ферментации штамма *B.lactofermentum* 150/рРС6 наблюдается низкий уровень сегрегационной стабильности плазмиды рРС6. Линзинсинтезирующая активность рекомбинантного штамма 150/рРС6 сохраняется на уровне синтеза линзина родительским штаммом.

Կառուցվել է рРС6 հիբրիդային պլազմիդը, որը կրում է *E. coli*-ի ՖԷՊ-կարբոքսիլազի գենը և ընդունակ է կրկնօրինակվել կորինեֆորմալտերիոսների բջիջներում և լեկտրապորացիայի եղանակով ստացվել են *B. flavum*-ի և *B.lactofermentum* ի րժՏԵ պլազմիդ պարունակող տրանսֆորմանտները: Ստացված տրանսֆորմանտների բջիջներում ՖԷՊ-կարբոքսիլազի ակտիվությունը բարձրացել է երկու անգամ: Ֆերմենտացիայի պայմաններում *B.lactofermentum* ի 150/րժՏԵ շտամի րժՏԵ պլազմիդի սեգրեգացիոն կայունությունը ցածր է: *B.lactofermentum* ի 150/րժՏԵ ռեկոմբինանտ շտամը լինզին սինթեզելու ունակությամբ չի տարբերվում ծնողական ձևից:

The hybrid plasmid рРС6 was constructed. The plasmid contained the PEP-carboxylase gene of *E.coli* and was able to replicate in coryneform bacteria. By electroporation method the transformants of *B.flavum* and *B.lactofermentum* strains with the plasmid рРС6 were obtained. The PEP-carboxylase activity in coryneform transformants was increased twice. At fermentation processes the segregation stability of the plasmid рРС6 in cells of *B. lactofermentum* strain 150/рРС6 was low. The level of lysine synthesis in the recombinant strain 150/рРС6 was not changed.

*Коринебактерии - rrc ген - фосфоенолпируват карбоксилаза*

Глютаматсинтезирующие коринеформные бактерии, включая близкородственные виды *Corynebacterium glutamicum*, *B.flavum* и *B.lactofermentum*, давно используются в микробиологическом производстве аминокислот. Пути биосинтеза аминокислот у этих видов бактерий интенсивно исследуются. Выделен ряд генов биосинтеза различных аминокислот, изучаются механизмы регуляции их экспрессии [8,13].

Фосфоенолпируват карбоксилаза (ФЕП-карбоксилаза) занимает одно из ключевых мест в биосинтезе аминокислот, участвуя в анаплеротическом превращении ФЕПа в шавелевоуксусную кислоту (ЩУК), которая является предшественником аспарагиновой кислоты. Свойства ФЕП-карбоксилазы *E.coli*, а также некоторых видов коринебактерий хорошо изучены [5,11]. Показано, что активаторами этого фермента в обоих случаях являются ацетил-КоА, фруктозо-1,6-дифосфат, фермент подвержен обратному ингибированию аспаратом и 2-оксоглутаратом. В клетках *B.flavum* ген ФЕП-карбоксилазы подвергается репрессии глютаматом и аспаратом [15]. Представляет большой интерес возможность использования рекомбинантных плазмид с геном ФЕП-карбоксилазы для усиления путей биосинтеза тех или иных аминокислот. В клетках *E.coli*, содержащих плазмиду с геном *rrc*, наблюдается повышение активности ФЕП-карбоксилазы [7]. Определена нуклеотидная последовательность гена ФЕП-карбоксилазы *S.glutamicum* [4]. Показано, что введение в штаммы *B.lactofermentum* плазмиды, содержащей ген ФЕП-карбоксилазы из того же вида бактерий, приводит к повышению уровня синтеза некоторых аминокислот (пролина, лизина) [14].

Цель настоящей работы заключалась в конструировании плазмиды рРС6, содержащей ген ФЕП-карбоксилазы *E.coli*, а также анализе ряда свойства, полученных с помощью этой плазмиды, трансформантов коринеформных бактерий.

Материал и методика. Штаммы, плазмиды, среды. Бактериальные штаммы и плазмиды, используемые в работе, перечислены в табл. 1.

Таблица 1.

Штаммы	Генотип	Источник
<i>E.coli</i> K-12		
XSID2	$\Delta$ (rrc-argE)101 nalArgpB( $\lambda$ ) <sup>+</sup> hsdR	
<i>B.flavum</i> E-531	met thr AЭЦ	лаб.коллекция музей Института "Биотехнология"
<i>B.lactofermentum</i> 150	leu ser AЭЦ	
Плазмиды pALM1 pBLK25	rrc' argE:СВА' Ap' целочный вектор Km'	лаб.коллекция лаб.коллекция

Клетки *E.coli* выращивали в L-бульоне при 37°, а также в минимальной среде М9 с добавками глюкозы, тиамина, MgSO<sub>4</sub>, аргинина и сукцината натрия [10]. Для отбора *rrc*'

трансформантов *E.coli* использовали агаризованную среду M9, не содержащую сукцината натрия. Канамицин добавляли в концентрации 30 мкг/мл. Штаммы *B.flavum* и *B.lactofermentum* выращивали в L-бульоне при 30°. Отбор трансформантов вели на L-агаре, содержащем 30 мкг/мл канамицина.

**Выделение ДНК и трансформация.** Выделение ДНК из *E.coli*, обработку ДНК рестриктазами, реакцию лигирования, электрофорез ДНК в агарозном геле проводили согласно известным методам [9]. Для выделения ДНК из корнебактерий клетки лизировали в буфере, содержащем 25 мМ трис-HCl, 10 мМ ЭДТА, 50 мМ глюкозы, 10 мг/мл лизоцима (рН 8), с предварительной инкубацией при 37° в течение 1,5 часов. Далее выделение проводили согласно методу [3].

Трансформацию *E.coli* проводили методом [9]. Трансформацию клеток *B.flavum* и *B.lactofermentum* осуществляли методом электропорации. Ночную культуру разводили в 10 мл в L-бульоне и выращивали до титра  $1 \times 10^8$  кл/мл. Культуру осаждали центрифугированием и осадок суспендировали в 10%-ном глицерине. Клетки вновь осаждали центрифугированием и суспендировали в 1/10 объема раствора 10%-ного глицерина. К 25 мкл клеточной суспензии добавляли 0,5 - 1 мкг ДНК и полученную смесь вносили в ячейку для электропорации прибора Phamphor-500. После воздействия электрического поля клетки выдерживали в течение 1-5 мин во льду, добавляли 1 мл L-бульона и инкубировали при 30° в течение 12 ч для обеспечения экспрессии внесенных генов. Трансформированные клетки высевали на чашки с L-агаром, содержащим 30 мкг/мл канамицина, и инкубировали в течение 2-3 суток при 30°.

**Определение активности ФЭП-карбоксилазы.** Клетки выращивали в L-бульоне до титра  $1 \times 10^8$  кл/мл, осаждали центрифугированием, промывали буфером (0,1 М трис-HCl, рН 7,5), суспендировали в том же буфере и разрушали озонированием. Активность ФЭП-карбоксилазы определяли в сульфатной фракции клеточных экстрактов по известному методу [12]. Реакционная смесь состояла из 0,1 М трис-HCl, (рН 7,4), 3,3 мМ  $MnSO_4$ , 0,15 мМ NADH, 10 мМ  $NaHCO_3$ , 2 мМ ФЭП, 0,1 мМ  $Al_2O_3$ -KOH, 10 мкл малакдегидрогеназы и 10 мкл клеточного экстракта соответствующего разведения; общий объем смеси составил 1 мл. Реакцию проводили в кварцевых кюветках при комнатной температуре. 1 единице активности ФЭП-карбоксилазы соответствует количество фермента, при котором 1 мкмоль NAD превращается в NADH за минуту.

**Результаты и обсуждение.** Клонирование гена *prc* *E.coli* на челночном векторе pB1K25. Ранее была получена плазмида pALM1, которая несет фрагмент хромосомной ДНК *E.coli*, содержащей оперон *argECBVI* [1]. На генетической карте *E.coli* K 12 рядом с этим опероном расположен ген *prc* [10]. Плазмида pALM1 оказалась способной комплементировать мутацию  $\Delta prc$  в штамме *E.coli* XS1D2, что указывает на присутствие в ней по крайней мере структурной части гена *prc*.

Фрагмент ДНК с геном *prc* был перенесен на челночный вектор pB1K25. Вектор pB1K25, размером 8,7 тпо, способен реплицироваться в клетках *E.coli* и корнебактерий и содержит ген устойчивости к канамицину [2]. ДНК вектора pB1K25 и плазмиды pALM1 обрабатывали совместно рестриктазами BamHI и Sall и

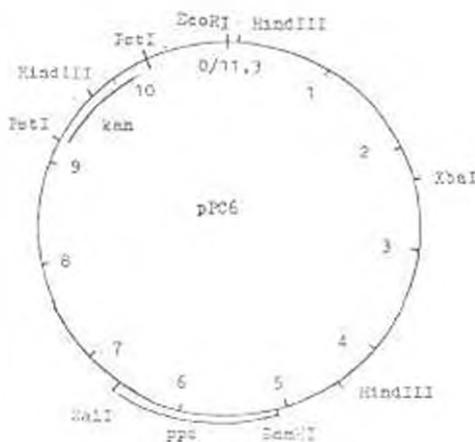


Рис. 1. Физическая карта плазмиды pRC6 (11,3 тпо).

— — — — — фрагмент ДНК *E.coli* с геном ФЭП-карбоксилазы (*prc*).

— — — — — ДНК вектора pB1K25

kan - ген аминогликозид 3-фосфотрансферазы.

полученные фрагменты ДНК соединяли ДНК-лигазой фага Т4. Лигированной смесью трансформировали клетки штамма *E.coli* XSID2. Трансформанты отбирали по способности комплементировать мутацию  $\Delta$  *prc* штамма XSID2, т.е. по способности расти на среде M9 в условиях отсутствия сукцината. Среди трансформантов были отобраны клоны, содержащие плазмиду размером 11,3 тпо, которая была названа pPC6 (рис.1). Рекомбинантная плазида pPC6 при трансформации штамма XSID2 сохраняет способность комплементировать мутацию  $\Delta$  *prc*. С помощью рестрикционного анализа показано наличие в составе плазмиды pPC6 *Bam*HI-SalI фрагмента ДНК размером 2.6 тпо.

Трансформация клеток *B.flavum* и *B.lactofermentum* плазмидой pPC6. Трансформацию клеток коринебактерий плазмидой pPC6 проводили методом электропорации. Трансформации подвергались штаммы *B.flavum* E-531 и *B.lactofermentum* 150. Метод электропорации описан выше. Трансформанты отбирали на L-агаре, содержащем 30 мкг/мл канамицина. Наибольший выход трансформантов наблюдался при емкости электрического импульса в 40 микрофарад. Эффективность трансформации при этом составляет  $10^4$  трансформантов на 1 мкг ДНК плазмиды pPC6. Выделенные из устойчивых к канамицину трансформантов E-531/pPC6 и 150/pPC6 плазмиды по структуре и фенотипическим свойствам не отличаются от плазмиды pPC6.

Активность ФЕП-карбоксилазы в клетках рекомбинантных штаммов E-531/pPC6 и 150/pPC6. Активность ФЕП-карбоксилазы определяли в клетках штаммов E-531/pPC6 и 150/pPC6, выращенных в L-бульоне, содержащем 30 мкг/мл канамицина. Как показано в табл. 2, активность ФЕП-карбоксилазы в трансформированных плазмидой pPC6 клетках почти в два раза выше, чем в клетках исходных штаммов, а также в штаммах, содержащих вектор pBHK25. В данных экспериментах активаторами ФЕП-карбоксилазы являлись ацетил-КоА и фруктозо-1,6-дифосфат. Активность ФЕП-карбоксилазы в клеточных экстрактах штаммов E-531/pPC6 и 150/pPC6 зависит от диоксана, что является характерным для фермента из *E.coli* [6], но не для ферментов коринебактерий. Во всех исследованных штаммах активность ФЕП-карбоксилазы ингибировалась аспаратом.

Таблица 2. Активность ФЕП-карбоксилазы в штаммах, содержащих плазмиду pPC6

Штаммы		Активность ФЕП-карбоксилазы, единиц/мг белка
<i>E.coli</i>	XSID2	-
	XSID2/pPC6	0,153
<i>B.flavum</i>	E-531	0,121
	E-531/pBHK25	0,101
	E-531/pPC6	0,215
<i>B.lactofermentum</i>	150	0,105
	150/pBHK25	0,100
	150/pPC6	0,194

Повышение активности ФЭП-карбоксилазы в трансформированных плазмидой рРС6 клетках *B.flavum* и *B.lactofermentum*, а также ее зависимость от диоксиана указывают на экспрессию энтробактериального ррс гена в клетках коринеформных бактерий, результатом которой является увеличение количества синтезированного в клетках фермента.

**Стабильность плазмиды рРС6 в клетках штамма *B.lactofermentum* 150/рРС6.** Исследовалась способность плазмиды рРС6 стабильно поддерживаться в популяции клеток штамма *B.lactofermentum* 150/рРС6 в условиях колбочочной ферментации. Ферментацию проводили в течение 72 ч на среде, содержащей 10% свекловичной мелассы (по редуцирующим веществам), 2% паприна (по сухому весу), 2% мела, рН 7,6. Концентрация канамицина составляла 30 мкг/мл. После ферментации определяли процент клеток, сохранивших устойчивость к канамицину, а также выход лизина. Согласно полученным результатам, плазида рРС6 в условиях отсутствия селективного давления крайне нестабильна. В конце ферментации только 12% клеток сохранили устойчивость к канамицину, обусловленную наличием в них плазмиды рРС6 (табл.3).

Вектор рВ1К25 в тех же условиях в клетках того же штамма проявляет высокий уровень стабильности. Причины нестабильности плазмиды рРС6 требуют дальнейших исследований. В присутствии антибиотика уровень стабильности плазмиды рРС6 повышается, однако титр клеток штамма 150/рРС6 в конце ферментации оказался на порядок ниже титра клеток, растущих на среде без антибиотика (табл. 3). Очевидно, что в присутствии антибиотика скорость роста штамма 150/рРС6 снижается. Определение лизинсинтезирующей активности штамма 150/рРС6 показало, что присутствие плазмиды рРС6 не влияет на продуктивность штамма. Несмотря на повышение активности ФЭП-карбоксилазы, штамм 150/рРС6 синтезирует столько же лизина, сколько бесплазмидный штамм 150 (35 г/л) (табл.3), что, вероятно, объясняется низким уровнем стабильности плазмиды рРС6 в условиях ферментации штамма 150/рРС6. Ингибирование ФЭП-карбоксилазы аспарагиновой кислотой также снижает эффект повышения активности этого фермента в клетках штамма 150/рРС6. При ферментации штамма 150/рРС6 на среде с антибиотиком лизинсинтезирующая активность штамма падает до 20 г/л, несмотря на повышение уровня стабильности плазмиды рРС6 (табл. 3). Очевидно, что уменьшение выхода лизина происходит вследствие понижения титра клеток в конце ферментации (табл. 3).

Таблица 3. Стабильность плазмиды рРС6 и лизинсинтезирующая активность штамма 150/рРС6.

Штамм	Титр клеток	Стабильность плазмиды, %	Выход, г/л
150	$8,2 \times 10^{11}$	-	35
150/рВ1К25	$6,5 \times 10^{11}$	93	35
150/рРС6	$4 \times 10^8$	84	20
150/рРС6	$5,8 \times 10^{11}$	12	35

Таким образом, введение в клетки штамма *V.flavum* E-531 и *V.lactofermentum* 150 плазмиды рРС6 с геном ФЕП-карбоксилазы *E.coli* приводит к повышению активности этого фермента в два раза. Однако уровень стабильности плазмиды рРС6 в условиях ферментации штамма 150/рРС6 низкий, что, вероятно, ограничивает возможности рекомбинантного штамма.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кочикян А.В., Метт И.Л., Аствацатурян М.З., Саканян В.А. Биолог. журн. Армении, 38, 79-83, 1985.
2. Оганесян Н.А., Безирджян М.О., Саканян В.А. Авт. свид. 4333147/3, 1989.
3. Birnboim M.C., Doly J. Nucl Acids Res. 7, 2, 1513-1523, 1979.
4. Eikmanns B.J., Follettie M.T., Griot M.U., Sinskey A. J. Mol. Gen. Genet., 218, 330-339, 1989.
5. Fujita N.T., Miwa S., Iahijima K., Izuki K., Katsuki H. J. Biochemistry, 95, 909-916, 1984.
6. Izui K., Yoshinaga T., morikawa M., Katsuki H., Woods A.E. Biochem. Biophys. Res. Commun., 40, 949-956, 1970.
7. Izui K., Sabe h., Katsuki H. FEBS Letters, 133, 2, 311-315, 1981.
8. Malumbres M., Mateos L.M., Lumbreras M.A., Guerrero C., Martin J.F. Applied and Environ. microbiology, 60, 7, 2209-2219, 1994.
9. Maniatis T., Fritsch E.F. Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York, 1982.
10. Miller J.H. Experiments of Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York, 1972.
11. Mori M., Shiiro I. J. Biochemistry, 97, 1119-1128, 1985.
12. Ozaki H., Shiiro I. J. Biochemistry, 66, 297-311, 1969.
13. Pisabarro A., Malumbres M., Mateos L.M., Oguiza J.A., Martin J.F. J. Bacteriology, 175, 6, 2743-2749, 1993.
14. Sano K., Ito K., Miwa K., Nakamori S. Patent USA, No. 4757009, 1988.
15. Shiiro I., Ujigawa K. J. Biochemistry, 84, 647-652, 1978.

Поступила 6.V.1997